

Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

**FORMACIÓN DE PATRÓN EN UNA  
ESTRUCTURA DINÁMICA.  
DESARROLLO PRÓXIMO-DISTAL EN  
LA EXTREMIDAD DE  
VERTEBRADOS**

Tesis Doctoral

Alberto Roselló Díez

Madrid, Diciembre 2010





El trabajo experimental presentado en esta memoria ha sido realizado en el *Departamento de Biología del Desarrollo Cardiovascular* del *Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares*, bajo la dirección del Dr. Miguel Torres Sánchez.

Durante la realización de esta tesis doctoral el doctorando disfrutó de una beca predoctoral I3P del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, una beca FPI del Ministerio de Educación y Ciencia y un Contrato de Personal Investigador de la Comunidad de Madrid.



A mis padres



*Un esfuerzo total es una victoria completa*

Mahatma Gandhi



## **Contenidos**

Summary.....	1
I. Introducción.....	5
I.1. La biología del desarrollo.....	7
I.1.1 Modelos animales.....	7
I.1.2 Técnicas empleadas por los biólogos del desarrollo.....	8
I.1.2.1 Trazado de linaje.....	8
I.1.2.2 Recombinasas inducibles. Cre-ER <sup>T2</sup> .....	9
I.1.2.3 El <i>locus</i> ROSA26. Líneas testigo de actividad Cre.....	10
I.2. La extremidad de vertebrado.....	11
I.2.1 Posicionamiento e identidad de los primordios.....	11
I.2.2 Inducción del primordio de extremidad.....	12
I.2.3 Centros de señalización en la extremidad.....	14
I.2.4 Interacción entre los distintos centros de señalización y control del tamaño de la extremidad.....	20
I.2.5 El eje próximo-distal de la extremidad.....	21
I.2.5.1 Interacciones epitelio-mesénquima.....	22
I.2.5.2 La información posicional reside en el mesénquima.....	23
I.2.5.3 Marcadores P-D.....	24
I.2.5.4 Modelos de formación de patrón P-D.....	28
I.2.5.5 Regulación frente a mosaicismo.....	35
I.2.5.6 Señales Próximo-Distales.....	38
I.2.5.7 Propiedades de adhesión en la extremidad.....	51
I.2.6 Evolución de la extremidad. Homología clásica y profunda.....	55
I.2.6.1 Vertebrados (ver capítulo 4 de (Hall, 2007))......	56
I.2.6.2 Desarrollo de la extremidad en <i>Drosophila</i> y otros artrópodos. Homología profunda.....	58
II. Objetivos.....	61
III. Materiales y Métodos.....	65
III.1. Materiales.....	67
III.1.1 Reactivos y kits.....	67
III.1.2 Retinoides, factores de crecimiento e inhibidores químicos.....	68
III.1.3 Enzimas.....	68
III.1.4 Anticuerpos.....	69
III.1.5 Plásmidos.....	69
III.1.6 Equipamiento.....	70
III.1.7 Modelos animales.....	70
III.1.8 <i>Software</i> científico/de imagen.....	70
III.2. Métodos.....	70
III.2.1 Generación de ratones <i>Knock-In</i> .....	70
III.2.1.1 Construcción de los vectores de <i>targeting</i> .....	70
III.2.1.4 Selección y verificación de colonias.....	73
III.2.1.5 Generación de quimeras.....	74
III.2.2 Determinación del genotipo de los ratones modificados genéticamente.....	76
III.2.3 Manipulación del embrión de pollo.....	77
III.2.3.1 Transplantes de zonas de progreso a somitos, a ala proximal, a futuro zeugopodio y a cabeza.....	77
III.2.3.2 Transplantes de 200 µm, con microesferas cargadas con distintas sustancias.....	77
III.2.3.3 Inserción de microesferas en el primordio de extremidad.....	78
III.2.3.4 Recombinantes de 100 micras distales.....	78



III.2.3.5 Trazado de linaje con DiI/DiO. ....	80
III.2.4 Extracción y genotipado de embriones de ratón. ....	81
III.2.5 Tinción de cartílago (y hueso). ....	81
III.2.5.1 Alcian Green. ....	81
III.2.5.2 Victoria Blue. ....	82
III.2.5.3a Alcian Blue/Alizarin Red. ....	82
III.2.5.3b Alcian Blue en secciones. ....	82
III.2.5.4 Alizarin Red en ratones adultos. ....	82
III.2.6 Hibridación <i>in situ</i> . ....	83
III.2.6.1 Procesamiento previo. ....	83
III.2.6.2 Síntesis de sondas. ....	83
III.2.6.3a Hibridación <i>in situ</i> simple sobre embrión completo. ....	83
III.2.6.3b Hibridación doble sobre embrión completo. ....	84
III.2.6.4 En secciones de parafina. ....	84
III.2.7 Congelación de muestras para criostato. ....	85
III.2.7.1 Inclusión en OCT. ....	85
III.2.7.2 Inclusión en gelatina-sacarosa. ....	85
III.2.8 Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. ....	85
III.2.8.1 Inmunohistoquímica para GFP en secciones de parafina. ....	85
III.2.8.2 Inmunohistoquímica para GFP en secciones de gelatina. ....	86
III.2.8.3 Inmunofluorescencia en secciones de gelatina. ....	86
III.2.8.5 TUNEL y $\alpha$ PH3 en secciones de gelatina. ....	87
III.2.8.6 TUNEL combinado con inmunofluorescencia en el embrión completo. ....	87
III.2.9 Tinción lacZ. ....	87
III.2.10 Amplificación y clonaje de nuevas sondas. ....	88
III.2.11 Análisis de expresión diferencial: experimento de <i>microarrays</i> . ....	89
III.2.12 Captura, análisis y procesamiento de imagen. ....	90
IV. Resultados. ....	91
IV.1. Trazado de linaje de las células que expresan <i>Meis1</i> , <i>Hoxa11</i> y <i>Hoxa13</i> en la extremidad. ....	93
IV.1.1 Generación de las líneas <i>Meis1</i> <sup>CreERT2/+</sup> , <i>Hoxa11</i> <sup>CreERT2/+</sup> y <i>Hoxa13</i> <sup>CreERT2/+</sup> . ....	93
IV.1.2 Trazado de linaje. ....	94
IV.2. Expresión de <i>Meis1</i> en la extremidad adulta. ....	99
IV.3. Papel de mecanismos autónomos y no autónomos en la formación de patrón próximo-distal. ....	100
IV.3.1 Evaluación del modelo de trasplante distal como ensayo de reprogramación de las células de la extremidad. ....	100
IV.3.2 Evaluación del efecto de señales endógenas sobre el patrón próximo-distal de trasplantes de extremidad. ....	101
IV.3.3 Uso de extremidades recombinantes para evaluar el efecto de señales endógenas en la formación de patrón próximo-distal. ....	106
IV.3.4 Comprobación del modelo bifásico en extremidades no recombinantes. ....	117
IV.4. Papel de <i>Meis2</i> en el desarrollo P-D de la extremidad. ....	120
IV.4.1 Sobreexpresión aleatoria de <i>Meis2</i> . Diferencias en la distribución celular. ....	120
IV.4.2 Efectos de la sobreexpresión aleatoria de <i>Meis2</i> en las propiedades celulares. ....	125
IV.4.3 Efecto de la sobreexpresión de <i>Meis2</i> en el linaje <i>Shh</i> . ....	131
IV.4.4 Comparación transcriptómica entre células silvestres y <i>Meis2</i> pertenecientes al linaje <i>Shh</i> . ....	135
V. Discusión. ....	145
V.1 Relación entre la expresión génica y el destino P-D. ....	147
V.1.1 Linaje de <i>Hoxa13</i> . ....	147

V.1.2 Linaje de <i>Meis1</i> .....	149
V.2 Papel de señales endógenas en el desarrollo P-D de la extremidad. ....	150
V.2.1 Papel de RA endógeno. ....	150
V.2.2 Efectos y requerimiento temporal de los FGFs. Implicaciones para el modelo..	151
V.3 Papel de los genes <i>Meis/Hox</i> en el desarrollo P-D de la extremidad.....	155
V.3.1 Función tardía de <i>Meis/Hox</i> . ....	155
V.3.2 Función temprana de <i>Meis/Hox</i> .....	156
V.4 Propiedades de adhesión en la extremidad.....	157
V.4.1 Desplazamiento de puntas de extremidad transplantadas en zeugopodio.....	157
V.4.2 Relación entre propiedades de adhesión y eliminación de células localizadas en una región “errónea” de la extremidad. ....	158
V.4.3 ¿Un nuevo componente del sistema de adhesión?.....	160
V.5 Recopilación e integración de los datos disponibles. ....	160
V.5.1 Modelo híbrido de desarrollo P-D de la extremidad. ....	160
V.5.2 Reflexión sobre los marcadores P-D, la especificación y la identidad. ....	165
V.6 Evolución de la extremidad. ....	166
VI. Conclusiones.....	167
VII. Material Suplementario .....	171
VII.1 Expresión de <i>CreERT<sup>2</sup></i> en las líneas generadas.....	173
VII.1.1 Comparación de la expresión con NeoR y sin NeoR en la línea <i>Meis1<sup>CreERT2/+</sup></i> . ....	173
VII.1.2 Expresión de <i>Hoxa11</i> y <i>CreERT<sup>2</sup></i> en especímenes más avanzados de <i>Hoxa11<sup>CreERT2/+</sup></i> .....	173
VII.2 Marcaje temprano del linaje <i>Hoxa13</i> . ....	174
VII.2.1 Datos incluyendo una camada más avanzada.....	174
VII.3 Experimentos adicionales con puntas distales de primordio de extremidad.....	174
VII.3.1 Inhibición de CYP26 en trasplantes de 200 micras. ....	174
VII.3.2 Tripsinización y sustitución de ectodermo en trasplantes de punta distal... ..	175
VII.4 Experimentos adicionales con recombinantes.....	176
VII.4.1 Recombinantes con mesénquima de pata. ....	176
VII.5 Sobreexpresión de <i>Meis2</i> . ....	176
VII.5.1 Tabla S1. Datos crudos del recuento de células <i>Meis2</i> y <i>LacZ</i> .....	176
VII.5.2 Expresión de otros marcadores de fagocitos. ....	180
VII.6 Discusión sobre los experimentos de trazado de linaje. ....	180
VII.6.1 Elección de los genes cuyo linaje se iba a estudiar. ....	180
VII.6.2 Funcionamiento de las líneas de ratón generadas. ....	181
VII.7 Consideraciones sobre los experimentos de trasplantes.....	182
VII.7.1 Modelo de trasplante de punta distal.....	182
VII.7.2 Modelo de extremidades recombinantes (RLs). ....	182
VII.8 Consideraciones sobre el experimento de <i>microarrays</i> . ....	183
VIII. Bibliografía.....	185
IX. Apéndices.....	201
IX.1 Abreviaturas, términos en inglés. ....	203
IX.2 Preguntas técnicas frecuentes.....	204
Agradecimientos .....	207



# **SUMMARY**



An important question in developmental biology is how pattern of the different tissues is achieved. This question is particularly difficult to address within highly proliferative structures, where growth and pattern have to be tightly coordinated. Vertebrate limb development represents a longstanding model with which it is possible to address this kind of questions. Indeed, proximo-distal (P-D) limb development is a paradigmatic model of patterning within a dynamic structure, and thus it has been used in the present work. Classical transplantation experiments coupled with molecular analysis, and genetic manipulation coupled with lineage tracing have allowed us to shed some light on the aforementioned problem.

We have traced the lineage of *Meis1*- and *Hoxa13*-expressing cells in the mouse limb at different stages, reaching the conclusion that *Hoxa13* is exclusively expressed in cells belonging to the autopod (the distal-most element of the limb), first to the posterior four digits, then to the remaining one and finally to the wrist/ankle region. With respect to *Meis1*, its lineage can contribute first to the whole limb, but it is afterwards restricted to part of the stylopod (the proximal-most element of the limb).

By genetic manipulation of the mouse, we have overexpressed *Meis2* in the limb bud, either randomly or in a regionally restricted manner. The ectopic expression of *Meis2* in non-proximal segments caused a modification in cellular behaviour, especially in terms of cell-to-cell adhesion properties. The transcriptomic comparison of WT and *Meis2*-overexpressing equivalent regions has allowed us to obtain a list of putative *Meis2* targets, some of which have been validated by *in situ* hybridization or immunodetection assays. Further tests of these and other targets will permit the elucidation of *Meis* genes roles within the limb primordium.

Finally, transplantation of distal limb bud cells to different locations in the chick embryo and manipulation of different signalling pathways have revealed that P-D limb patterning can be subdivided into two phases. The first phase is essentially non-autonomous, governed by the opposing actions of retinoic acid (RA) and fibroblast growth factors (FGFs), as it had been suggested in previous works. During this phase, *Meis1/2* expression, which initially covers the whole limb primordium, is eventually downregulated in the distal region, where *Hoxa11* is expressed concomitantly. The end of the first phase primes the second one, during which patterning is mainly controlled by an autonomous mechanism rather than by instructive diffusible signals, leading to *Hoxa13* expression after a fixed time. Further interaction between the expression domains probably refines the final pattern of expression of these genes. This hybrid model integrates most of the available data and is able to explain apparently contradictory results in the literature. Furthermore, it is likely that this model can also be applied to other systems in which RA and FGF have opposing roles, opening a whole new range of possible interpretations of existing data.

All together, the results presented in this work represent a step forward in our understanding on how to pattern a dynamic structure, and open some interesting questions that will be worth studying in the future.



# **I. INTRODUCCIÓN**





## I.1. La biología del desarrollo.

La biología del desarrollo estudia todos los cambios que ocurren desde la formación del cigoto (embrión de una sola célula) hasta el organismo adulto. Estos cambios implican la integración y coordinación de diversos procesos, como la interpretación de información preexistente (señales dentro del óvulo, o lugar de entrada del espermatozoide), la proliferación celular, el crecimiento de los órganos hasta un tamaño determinado con una forma determinada, la diferenciación celular y su organización espacial con un patrón concreto, la morfogénesis mediada por crecimiento, muerte o movimientos celulares locales... El estudio de todos estos mecanismos sólo es posible aunando los esfuerzos de varias disciplinas, como pueden ser la embriología, la genética, la biología molecular, la biología celular, la fisiología, la bioquímica, la biología evolutiva e incluso la física.

### I.1.1 Modelos animales.

Por necesidades tanto éticas como prácticas, la biología del desarrollo animal debe limitar su estudio a un número reducido de especies de metazoos. Los requisitos habituales son:

- facilidad de cría en el laboratorio y/o facilidad de obtención de un alto número de embriones.
- tiempo de generación corto (especialmente si se van a realizar manipulaciones genéticas).
- facilidad de observación/manipulación directa. Para ello interesan embriones grandes y resistentes.
- posibilidad de realizar manipulación genética.
- posición clave en el árbol evolutivo para deducir relaciones filogenéticas. La cercanía al ser humano es deseable para la extrapolación de conclusiones aplicables al ámbito clínico.

Los principales organismos modelo utilizados en biología del desarrollo son: el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*, el pez cebra *Danio rerio*, el sapo africano *Xenopus laevis*, el pollo *Gallus gallus* y el ratón común *Mus musculus*. Además, para algunos estudios que requieren de características muy concretas, se usan el anfibio *Brachyostoma lanceolatum* (posición filogenética clave como cefalocordado), el ajolote *Ambystoma mexicanum* o la hidra *Hydractinia echinata* (extraordinaria capacidad de regeneración), diversos equinodermos (primero muy utilizados en embriología clásica por su facilidad de visualización y manipulación, hoy en día su genoma resulta útil para estudiar la evolución de la inmunidad innata) y muchos otros. Ninguno de ellos reúne todos los requisitos mencionados, pero cada uno resulta especialmente útil para algunas aplicaciones concretas. En esta tesis se han utilizado los modelos de pollo y de ratón.

El modelo de pollo resulta especialmente adecuado por su accesibilidad para la manipulación física, ya sean experimentos de trasplantes (históricamente se han usado mucho combinaciones pollo-codorniz para distinguir el tejido transplantado del receptor), marcajes con colorantes para realizar trazado de linaje, electroporación de construcciones para provocar la ganancia o pérdida de función de genes concretos o también para trazado de linaje, inyección de virus competentes en replicación para conseguir la sobreexpresión de un gen concreto en una zona amplia del embrión, o incompetentes en replicación para afectar sólo al linaje de las células marcadas inicialmente. Sólo las manipulaciones en estadios más tempranos o la visualización continua no se pueden realizar *in ovo*, pero para ello se han desarrollado diversos sistemas de cultivo que resultan de lo más conveniente. Los huevos fecundados se pueden comprar a un precio relativamente bajo a granjas especializadas (en España hay al menos tres) y se pueden mantener en "hibernación" a 16°C durante unos días sin afectar mucho a su viabilidad. Además, modificando el momento de incubación y la temperatura, se pueden obtener embriones en el

## I. INTRODUCCIÓN

---

estadio deseado a cualquier hora del día, característica nada desdeñable desde el punto de vista del investigador. Aunque con errores de ensamblado, su genoma está secuenciado, lo que facilita, como ya se ha comentado, abordajes genéticos funcionales. Incluso existen cepas de pollos modificados genéticamente, que expresan la proteína fluorescente verde de manera ubicua (McGrew *et al.*, 2004; Chapman *et al.*, 2005; Koo *et al.*, 2006).

El modelo de ratón presenta en principio varias desventajas prácticas, como el alto coste de recursos requerido para mantener una colonia, el elevado tiempo de generación, la imposibilidad de controlar el momento exacto de concepción o la velocidad del desarrollo, así como la elevada dificultad (que no imposibilidad) de manipular el embrión directamente, *in utero*. Este último inconveniente está parcialmente subsanado por el desarrollo de diversos métodos para cultivar el embrión murino (Zuniga *et al.*, 1999; Rivera-Perez *et al.*, 2010). No obstante, presenta una gran ventaja sobre el resto de modelos: la posibilidad no sólo de insertar transgenes aleatoriamente en el genoma (algo que se puede hacer también en otros modelos), sino también de realizar reemplazamiento y/o eliminación de virtualmente cualquier fragmento del genoma, mediante la técnica de *gene targeting*. Eso lo convierte en uno de los modelos más poderosos disponibles. Sin embargo, es probable que quizá pronto otros organismos le disputen ese puesto, en vista de las nuevas herramientas (*zinc-finger nucleases*) que permiten la eliminación de secuencias genómicas específicas (Geurts *et al.*, 2009; Geurts *et al.*, 2010; Geurts y Moreno, 2010), o del reciente éxito en aplicar un sistema similar al de ratón en las células ES de rata (Tong *et al.*, 2010). Otras ventajas del modelo de ratón son la elevada disponibilidad de embriones, y que por su posición filogenética cercana al ser humano, las conclusiones obtenidas con este modelo son, *a priori*, más directamente aplicables al ámbito clínico.

### I.1.2 Técnicas empleadas por los biólogos del desarrollo.

Una posible clasificación de las técnicas empleadas en esta disciplina sería dividir las en descriptivas y manipulativas. Como su nombre indica, las primeras se utilizan para describir el desarrollo en condiciones normales, ya sea mediante observación directa, hibridación *in situ* para detectar mensajeros de RNA, inmunolocalización de proteínas, o uso de procedimientos físicos mínimamente invasivos o incluso genéticos para realizar marcajes que permitan el trazado de linaje. En cuanto a las técnicas manipulativas, consisten en analizar la respuesta del embrión (de sus células) ante una modificación de la situación natural, ya sea mediante manipulación física directa (experimentos de trasplantes, ablación de células concretas), o genética (generación de clones o embriones defectuosos para un gen, o que lo sobreexpresan).

Como en toda clasificación, los límites entre ambas categorías están difusos, y a veces ambas pueden combinarse para dar lugar a las técnicas más refinadas. Es el caso del trazado de linaje genético.

#### I.1.2.1 Trazado de linaje.

El trazado de linaje consiste en la determinación de relaciones de descendencia entre células en dos momentos distintos del desarrollo. Es decir, qué células en un momento concreto provienen de cuáles presentes en un estadio anterior.

Hay dos tipos de trazados de linaje (Petit *et al.*, 2005): *prospectivo*, en el que se marca un grupo de células conocidas y después se observa a qué estructuras dan lugar sus descendientes, y *retrospectivo*, en el que la célula o células marcadas inicialmente no son conocidas, de modo que lo que se puede conocer es que las células que al final se observan marcadas están relacionadas por linaje con esas células desconocidas inicialmente marcadas.

Existen numerosos métodos de trazado de linaje, que van desde la observación directa en organismos transparentes al marcaje de células individuales mediante métodos genéticos, pasando por la creación de quimeras interespecíficas o la inyección de colorantes lipofílicos o proteínas testigo incapaces de atravesar la membrana celular (revisión exhaustiva en (Petit *et al.*, 2005; Arques, 2007))

Para resolver algunos tipos de problemas en biología del desarrollo (distinguir si células pertenecientes a distintos tejidos tienen un progenitor común o si células pertenecientes a una misma estructura provienen de una o de varias células progenitoras) interesa un tipo de trazado de linaje en el que se marca una sola célula inicial, de modo que todas las células que se observan marcadas finalmente son un clon procedente de un mismo progenitor. Esto es lo que se conoce por *análisis clonal* (Petit *et al.*, 2005). En esta tesis se ha utilizado una variante de este tipo de análisis, en la que, en lugar de marcar una sola célula al azar, se marcan varias células de una población definida por alguna característica común, como la expresión de un gen concreto, y se analiza la contribución del linaje de dicha población a una estructura de interés, como la extremidad.

Aunque hay diversos métodos de marcar una sola célula (o una población), el más potente es la inducción de una modificación genética cuya frecuencia se pueda controlar a lo largo de un rango amplio. La modificación genética puede ser muy variada y versátil, se modo que se puede provocar la expresión de un testigo (para determinar relaciones de linaje), o la falta de función de un gen (pudiendo discriminar efectos autónomos de no autónomos o examinar mutaciones que son letales embrionarias), o la sobreexpresión de un gen. Para ello, resultan especialmente útiles las recombinasas inducibles.

#### I.1.2.2 Recombinasas inducibles. Cre-ER<sup>T2</sup>.

Las recombinasas son enzimas que catalizan eventos de recombinación genética de doble hebra (Branda y Dymecki, 2004). La mayor parte reconocen unas secuencias de pares de bases específicas que sirven de punto de corte para el evento de recombinación, ya sea éste una inserción (de un fragmento circular con una secuencia diana en otro fragmento con secuencia diana), una eliminación (de un fragmento flanqueado por secuencias diana en idéntica orientación), una inversión (de un fragmento de DNA flanqueado por secuencias diana en orientación opuesta) o una translocación entre cromosomas no homólogos (entre dos cromátidas que tengan un sitio diana cada una (Branda y Dymecki, 2004))

Una de las más utilizadas es la recombinasa Cre, perteneciente a la superfamilia de las integrasas  $\lambda$ , y que está presente de forma natural en el fago P1 de *Escherichia coli*.

Esta recombinasa reconoce unas secuencias diana en el DNA llamadas *lox-P*. Consisten en 34 pares de bases distribuidas en un núcleo no palindrómico (y que es el que determina la orientación) flanqueado por dos regiones palindrómicas de 13 pares de bases cada una. Cuando la Cre reconoce dos sitios *lox-P*, los corta en el núcleo y los vuelve a recomponer intercambiando los fragmentos (Abremski y Hoess, 1985; Hoess y Abremski, 1985).

Si bien se puede conseguir que la Cre quede bajo el control de promotores específicos de tejido (control espacial), para que actúe en un número variable de células se requiere que su actividad sea inducible, mediante un método que permita controlar la frecuencia y el momento de activación. Esto se logra mediante su fusión a un dominio de unión a un ligando específico, de modo que en ausencia de dicho ligando, la proteína de fusión queda secuestrada en el citoplasma y no puede acceder al núcleo celular para ejercer su acción. Cuando se administra el ligando, la proteína quimérica puede entrar al núcleo y se puede producir el evento de recombinación (Fig. I1), hasta que el ligando es eliminado del organismo (control temporal). Ajustando la cantidad de ligando administrada a la madre gestante, se puede controlar la frecuencia con la que esto ocurre en el embrión que expresa la recombinasa. El dominio de

## I. INTRODUCCIÓN

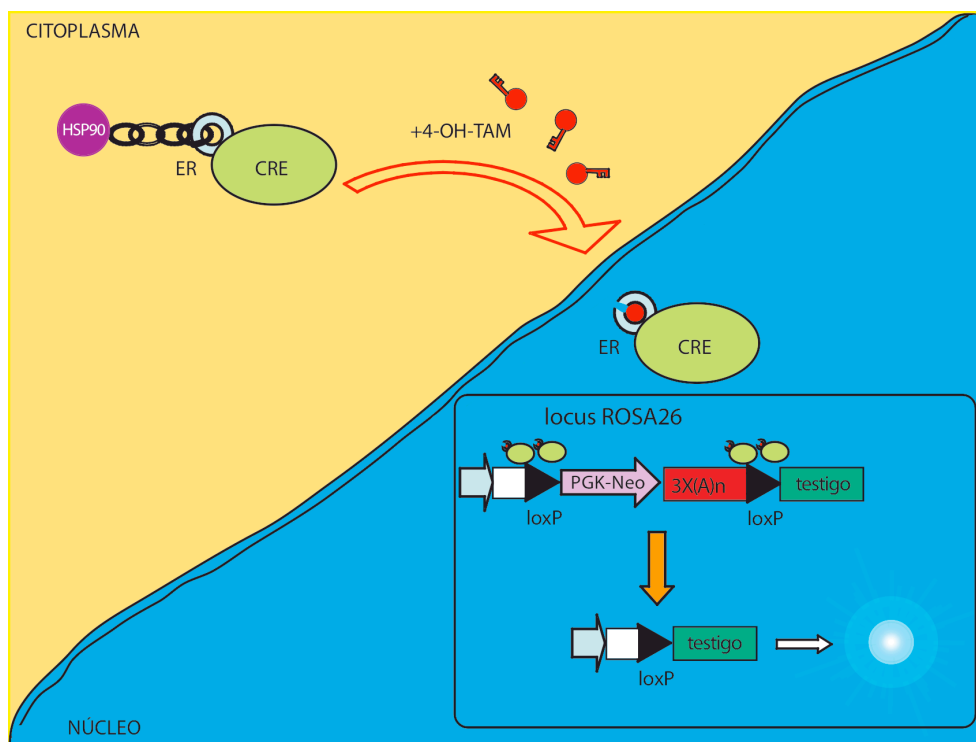
unión a ligando que mejor parece funcionar es el del receptor de estrógenos (ER) humano. Se usa una versión modificada del mismo (ER<sup>T2</sup>) que no responde a los estrógenos endógenos, sino a una droga llamada 4-hidroxitamoxifeno (4HT), con una afinidad muy alta (Indra *et al.*, 1999).

Para que el sistema funcione, además de la Cre inducible se necesita un testigo que responda a la actividad de dicha Cre. Para este fin resulta muy útil el *locus* ROSA26.

### I.1.2.3 El *locus* ROSA26. Líneas testigo de actividad Cre.

El gen ROSA26 tiene unas propiedades muy peculiares que hacen posible el trabajo de trazado de linaje. Codifica dos transcritos, generados por *splicing* alternativo, que dan lugar a RNAs nucleares, que se expresan ubicua y uniformemente en el embrión. La inserción de un gen exógeno en el locus provoca la disrupción de estos RNAs (Zambrowicz *et al.*, 1997), pero las líneas que presentan la inserción en homocigosis no tienen fenotipo alguno. La manera de conseguir la expresión ubicua y relativamente fuerte de un gen de interés es insertar en el primer intrón del *locus* ROSA26 el cDNA de dicho gen flanqueado por una secuencia aceptora de *splicing* y otra de poliadenilación. De este modo, tras la transcripción y traducción (el primer exón del *locus* ROSA26 no tiene codón de inicio de traducción) se produce la proteína de interés.

Para su utilización en el trazado de linaje, en el *locus* ROSA26 se inserta un gen testigo de actividad Cre (Soriano, 1999), y esa línea se cruza con otra que exprese una recombinasa Cre inducible. El gen testigo está precedido por una secuencia de fin de transcripción flanqueada por sitios *lox-P*, de modo que en ausencia de actividad Cre no puede expresarse. Cuando se activa la recombinasa, se elimina la secuencia de fin de transcripción, lo que permite que la célula en la que se ha producido la recombinación, y sus descendientes, expresen el gen testigo. (Fig. I1)



**Figura I1.** Esquema del sistema utilizado para el trazado de linaje. En ausencia de 4HT, la enzima Cre quimérica permanece secuestrada en el citoplasma, unida a HSP90. Cuando el 4HT llega a la célula, la recombinasa Cre se libera y puede entrar al núcleo. Allí provoca la recombinación entre los sitios *LoxP*, permitiendo que se exprese el gen testigo.

En un trabajo reciente de nuestro grupo (Arques, 2007), la expresión de la recombinasa era ubicua, ya que se había insertado en el extremo 3'UTR del locus de la subunidad grande de la RNA polimerasa II. La recombinación y por tanto la generación del clon podía producirse en cualquier parte del cuerpo al azar. Para el presente trabajo de investigación interesaba más restringir la expresión de la recombinasa a los distintos dominios de expresión génica diferencial en el eje próximo-distal (ver Objetivos).

## **I.2. La extremidad de vertebrado.**

Debido a la imposibilidad de estudiar el desarrollo embrionario en su totalidad, resulta imprescindible la elección de un modelo abarcable. El desarrollo de las extremidades en artrópodos y vertebrados representa un modelo excelente de generación y formación de patrón en una estructura embrionaria secundaria. En el caso de los vertebrados la extremidad es uno de los sistemas modelo más utilizados en este campo no sólo porque permite el análisis de los procesos básicos de la biología celular como proliferación, diferenciación y apoptosis sino por sus implicaciones para comprender la etiología de enfermedades congénitas humanas o los mecanismos de variación y diversificación morfológica durante la evolución (Owen, 1849; Shubin *et al.*, 1997). Una importante ventaja de este modelo es que las extremidades no son necesarias para el desarrollo del embrión, lo que permiten su manipulación sin interferir con la viabilidad de éste. Por otra parte se sabe que las vías de señalización implicadas en el desarrollo de la extremidad de vertebrados son similares en otros contextos embrionarios y, por tanto, los conocimientos obtenidos con este modelo son, en muchas ocasiones, extrapolables.

El desarrollo de la extremidad de vertebrados comienza con la formación de lo que se conoce como primordio temprano (*early limb bud*). Consiste en un abultamiento de células mesenquimales indiferenciadas, cubiertas por un epitelio. Dicho abultamiento es el resultado de que en regiones concretas del flanco del embrión se mantiene la alta tasa proliferativa que se estaba produciendo en estadios anteriores, mientras que en el resto del flanco esa tasa proliferativa disminuye (Searls y Janners, 1971). Entre el ectodermo y el mesénquima de ese primordio resultante se van a establecer una serie de interacciones que, como se verá más adelante, resultan imprescindibles para el crecimiento y la formación de patrón en la extremidad. Es destacable que, si bien los elementos esqueléticos, los tendones, la dermis y el tejido conectivo de la extremidad se forman a partir del mesénquima proveniente de la placa lateral, los músculos y el endotelio de los vasos sanguíneos proceden de poblaciones que invaden el primordio desde los somitos (Chevallier *et al.*, 1977; Christ *et al.*, 1977; Brand-Saberi *et al.*, 1995; Ambler *et al.*, 2001), los nervios son prolongaciones axonales provenientes del tubo neural (Hollyday, 1983), y los melanocitos derivan de la cresta neural (Serbedzija *et al.*, 1989).

### **I.2.1 Posicionamiento e identidad de los primordios.**

El primer evento en la formación de la extremidad de vertebrados es la determinación del nivel concreto del eje rostro-caudal en el que van a surgir las extremidades (2 niveles distintos en el caso de los tetrápodos, que tienen dos pares de apéndices). La correcta localización de los llamados *limb fields* (regiones del flanco que van a dar lugar a la extremidad) parece depender de la expresión de combinaciones concretas de genes *Hox* expresados en el flanco (Cohn *et al.*, 1997; Capdevila y Izpisua Belmonte, 2001). La regulación independiente de estos genes en flanco y mesodermo paraxial podría haber sido un evento clave en la evolución de apéndices pareados (Cohn *et al.*, 1997; Ruvinsky y Gibson-Brown, 2000).

## I. INTRODUCCIÓN

Si bien las extremidades superior e inferior comparten la mayor parte de los mecanismos moleculares para su desarrollo, también es cierto que ambas han evolucionado de manera diferente para adaptarse a necesidades distintas, y existe un pequeño conjunto de genes que se expresan de manera diferencial en una y otra. Es el caso de *Tbx4*, *Tbx5* y *Pitx1*. *Tbx5* se expresa sólo en el primordio superior, y los otros dos sólo en el primordio inferior (Chapman *et al.*, 1996; Gibson-Brown *et al.*, 1996; Shang *et al.*, 1997). Si bien los primeros estudios sugerían que *Tbx4* y *Tbx5* conferían la identidad de un tipo u otro de primordio (Logan y Tabin, 1999; Rodríguez-Esteban *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 1999), los estudios genéticos más recientes parecen indicar que ambos son necesarios para el crecimiento mantenido de la extremidad, pero intercambiables en lo que respecta a su identidad (Agarwal *et al.*, 2003; Rallis *et al.*, 2003; Minguillon *et al.*, 2005). En cuanto a *Pitx1*, su función no es necesaria para el crecimiento de la extremidad inferior, pero sí para su morfogénesis con una identidad adecuada, y su expresión ectópica en la extremidad superior confiere características de extremidad inferior (Lanctot *et al.*, 1999; Szeto *et al.*, 1999; Minguillon *et al.*, 2005). Sin embargo, mientras que algunos grupos sugieren que este efecto sobre la identidad es directo y ocurre junto a la actividad de una combinación específica de genes *Hox* (Minguillon *et al.*, 2005), otros sostienen que su efecto sobre la identidad se debe sólo a que controla la expresión de *Tbx4*, pues el fenotipo de los mutantes de *Pitx1* puede ser rescatado por *Tbx4* (Ouimette *et al.*, 2010). Es destacable que otro grupo ha comunicado recientemente en un congreso el resultado opuesto: que *Tbx4* no puede rescatar los defectos morfológicos debidos a la falta de función de *Pitx1*. En resumen, el mecanismo molecular concreto por el que se asigna la identidad superior o inferior a los primordios todavía no se conoce del todo.

### I.2.2 Inducción del primordio de extremidad.

Como ya se ha comentado, la interacción entre el ectodermo y el mesénquima de la extremidad resulta fundamental para la inducción y el crecimiento de ésta. Los factores de crecimiento fibroblástico (FGFs) y los factores Wnt juegan un papel principal. En el modelo más aceptado actualmente (Fig. I2, (Kawakami *et al.*, 2001)), la expresión restringida de *Fgf10* en el mesodermo lateral (LPM) a la altura de ambos primordios es fundamental para inducir una cascada que termina con la inducción de *Fgf8* en el ectodermo situado por encima. A su vez, FGF8 señaliza al mesénquima subyacente para mantener la expresión de *Fgf10* (Xu *et al.*, 1998), en un bucle de retroalimentación positivo que es responsable del crecimiento de la extremidad. Entre las incógnitas que quedan por resolver se encuentra cuál es el motivo por el que la expresión de *Fgf10*, inicialmente ubicua y difusa a lo largo del LPM, se restringe a partir de un momento dado a las regiones que darán lugar a la extremidad (*limb fields*). Hay experimentos que parecen demostrar la necesidad del mesodermo intermedio (IM) para la inducción del primordio de extremidad (Kieny y Dhouailly, 1969; Kieny, 1970; Pinot, 1970; Geduspan y Solursh, 1992). Se sabe además que microesferas impregnadas con diversos FGFs e implantadas en el flanco del embrión promueven la inducción de un primordio ectópico (Cohn *et al.*, 1995; Ohuchi *et al.*, 1995; Vogel *et al.*, 1996). También se ha descrito la expresión restringida de *Fgf8* en el IM de pollo y de ratón, a la altura de los primordios de extremidad, justo antes de su inducción (Crossley *et al.*, 1996; Vogel *et al.*, 1996; Agarwal *et al.*, 2003). Juntando estas evidencias, se propuso que el IM, a través de FGF8, era el responsable de la inducción de la extremidad. No obstante, esta hipótesis se descartó cuando se demostró que la colocación de barreras que impedían la activación de *Fgf8* en el IM (Fernandez-Teran *et al.*, 1997), o el tratamiento con un antagonista de la señalización FGF (Mercader *et al.*, 2006), así como la propia inactivación genética de *Fgf8* en ese tejido (Boulet *et al.*, 2004; Perantoni *et al.*, 2005), no influían negativamente en la inducción del primordio. Es más, un trabajo reciente ha mostrado



que, para que se produzca la inducción de la extremidad superior, la señalización FGF tiene de hecho que ser bloqueada en el mesodermo de la placa lateral por la señalización de ácido retinoico (RA) (Zhao *et al.*, 2009).

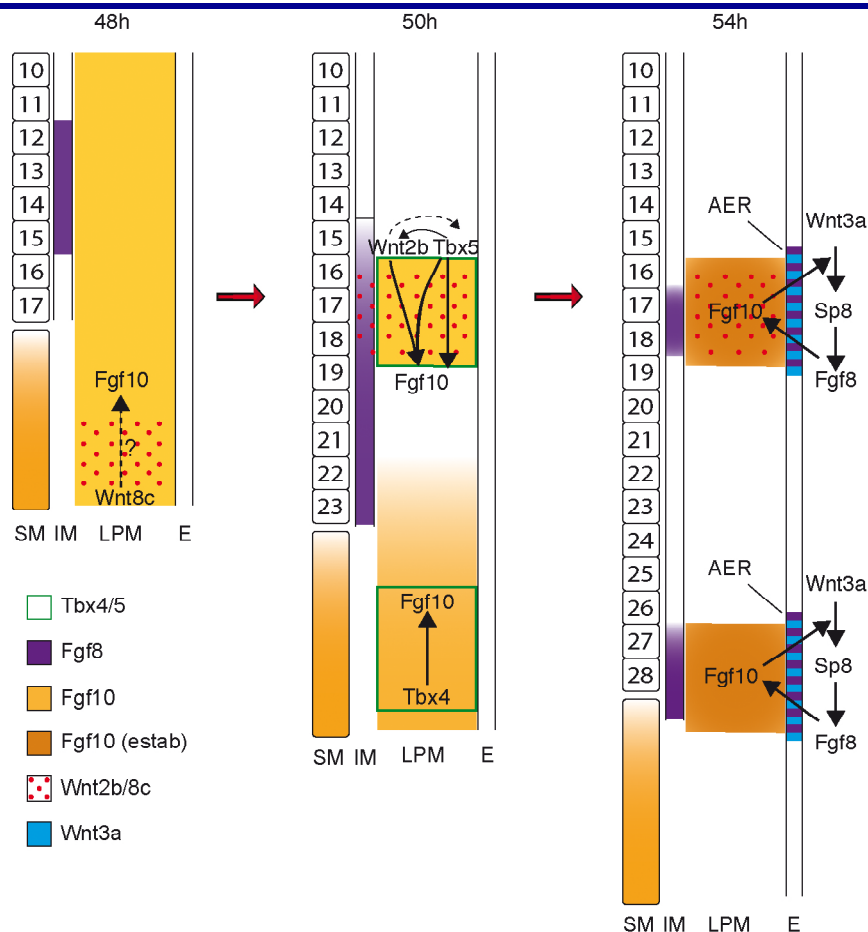
En cuanto al mediador de la señal inductora en el LPM, se ha mostrado que WNT2B y WNT8C actúan en ese tejido, a través de la vía dependiente de  $\beta$ -catenina, a la altura de la extremidad superior e inferior, respectivamente, para reforzar la expresión de *Fgf10* (Kawakami *et al.*, 2001). De hecho, la sobreexpresión de uno u otro en el flanco provoca el crecimiento de extremidades ectópicas (Kawakami *et al.*, 2001). Una vez que la expresión de *Fgf10* se mantiene en el LPM, señala al ectodermo que lo cubre, activando, a través de *Wnt3a* en pollo (Kengaku *et al.*, 1997; Kengaku *et al.*, 1998), *Wnt3* en ratón (Barrow *et al.*, 2003) y también *Sp8* (Kawakami *et al.*, 2004), la expresión de *Fgf8*, lo que termina la fase de inducción (Fig. I2).

Otros factores ya comentados con un papel en la inducción de la extremidad son *Tbx5* y *Tbx4*. La falta de función de *Tbx5* impide el surgimiento de la extremidad superior (Ahn *et al.*, 2002; Garrity *et al.*, 2002; Ng *et al.*, 2002; Agarwal *et al.*, 2003; Rallis *et al.*, 2003; Takeuchi *et al.*, 2003), mientras que su sobreexpresión ectópica en el flanco inter-extremidades puede dar lugar al crecimiento de una extremidad extra (Ng *et al.*, 2002; Takeuchi *et al.*, 2003). Se ha demostrado en varios vertebrados que *Tbx5* actúa por encima de la señalización WNT y FGF (Ng *et al.*, 2002; Agarwal *et al.*, 2003; Rallis *et al.*, 2003; Takeuchi *et al.*, 2003), y que de hecho es capaz de activar directamente *Fgf10* a través de sitios de unión en su promotor (Agarwal *et al.*, 2003). También parece ser necesario para el mantenimiento de la expresión de *Wnt2b* en el campo de extremidad superior de pollo (Takeuchi *et al.*, 2003), y para la expresión de *Tcf1/Lef1* (efectores de la vía canónica de Wnt) en el flanco de ratón (Agarwal *et al.*, 2003). Efectos y relaciones similares se han descrito para *Tbx4* y *Wnt8c* (Takeuchi *et al.*, 2003), aunque *Tbx4* no es estrictamente necesario para la inducción de la extremidad inferior, pero sí es requerido para el mantenimiento de *Fgf10* (Naiche y Papaioannou, 2003). Además, podría haber cierta variabilidad interespecies, porque en pez cebra se ha visto que la expresión de *tbx5* depende, al menos parcialmente, de *wnt2b*, algo que no se ha visto en el resto de especies analizadas (Ng *et al.*, 2002; Mercader *et al.*, 2006). De hecho, en el pez se ha propuesto que la activación de *wnt2b* en el IM depende de RA producido en los somitos, y que es *Wnt2b* el que activa *tbx5* en el campo de la extremidad (Mercader *et al.*, 2006). Ver apartado I.2.5.6 para más información acerca de RA.

**Figura I2 (página siguiente).** Modelo más aceptado para la inducción de la extremidad. El tiempo de desarrollo (pollo) se indica en la parte superior. En los estadios pre-inducción (izquierda), *Fgf10* se expresa por todo el mesodermo lateral (LPM) de manera difusa. En la región caudal, WNT8C quizá establezca su expresión, efecto que se apreciará unas horas más tarde. Durante la inducción (centro), tanto *Fgf8* como *Wnt2b* se expresan en el mesodermo intermedio (IM), y *Wnt2b* en el LPM también, a la altura de la extremidad superior, junto con *Tbx5*. WNT2B actúa a través de  $\beta$ -catenina (en combinación con TBX5, que a su vez también actúa de manera directa) para inducir/reforzar *Fgf10* en esa región. TBX4 jugaría un papel parecido en la región caudal. Finalmente (derecha), FGF10, consolidado en la parte rostral y caudal, activa, a través de WNT/ $\beta$ catenina, la expresión de *Fgf8* en el ectodermo (E). En cada estadio sólo se muestran los patrones de expresión más relevantes. Las flechas discontinuas indican una interacción lenta o no muy bien definida. AER= cresta ectodérmica apical. SM= mesodermo segmental. Modificado de (Kawakami *et al.*, 2001).



## I. INTRODUCCIÓN



La respuesta del ectodermo a FGF10, tanto durante la inducción como para el establecimiento del bucle de retroalimentación positivo entre FGF8 y FGF10, está mediada por la función de FGFR2 (receptor 2 de FGFs) en el ectodermo (Xu *et al.*, 1998). Más adelante se comentará en detalle el fenotipo de ratones mutantes para diversos FGFs y FGFRs. Además, también se ha descrito que *Tbx5* y *Tbx4* podrían tener un papel durante el crecimiento mantenido de la extremidad, precisamente participando de alguna manera en el bucle FGF8-FGF10 (Rallis *et al.*, 2003).

### I.2.3 Centros de señalización en la extremidad.

La extremidad se divide típicamente en 3 segmentos, en base a los elementos esqueléticos que la forman: estilopodio (húmero/fémur), zeugopodio (radio/tibia y cúbito/peroné) y autopodio (carpos/tarsos, metacarpos/metatarsos y falanges). Algunos autores dividen el autopodio en mesopodio (huesos de la muñeca/tobillo) y acropodio (el resto) (Fig. I3a). Se pueden distinguir 3 ejes fundamentales en una extremidad ya desarrollada: el eje dorso-ventral (D-V, del dorso a la palma de la mano), el eje próximo-distal (P-D, del hombro/cadera a la punta de los dedos) y el eje antero-posterior (A-P, del pulgar al meñique). Los elementos esqueléticos se forman en una secuencia de proximal a distal, primero mediante la formación de condensaciones de células indiferenciadas, que luego se diferencian a cartilago y finalmente, por un proceso de osificación endocondral, dan lugar a hueso (Kawakami *et al.*, 2006; Tabin y Wolpert, 2007; Zeller *et al.*, 2009). Para el establecimiento de patrón a lo largo de los 3 ejes mencionados, resultan fundamentales una serie de centros de señalización. Estos se caracterizan por la producción de

una o varias moléculas difusibles, que son las que organizan el patrón a lo largo del eje en cuestión.

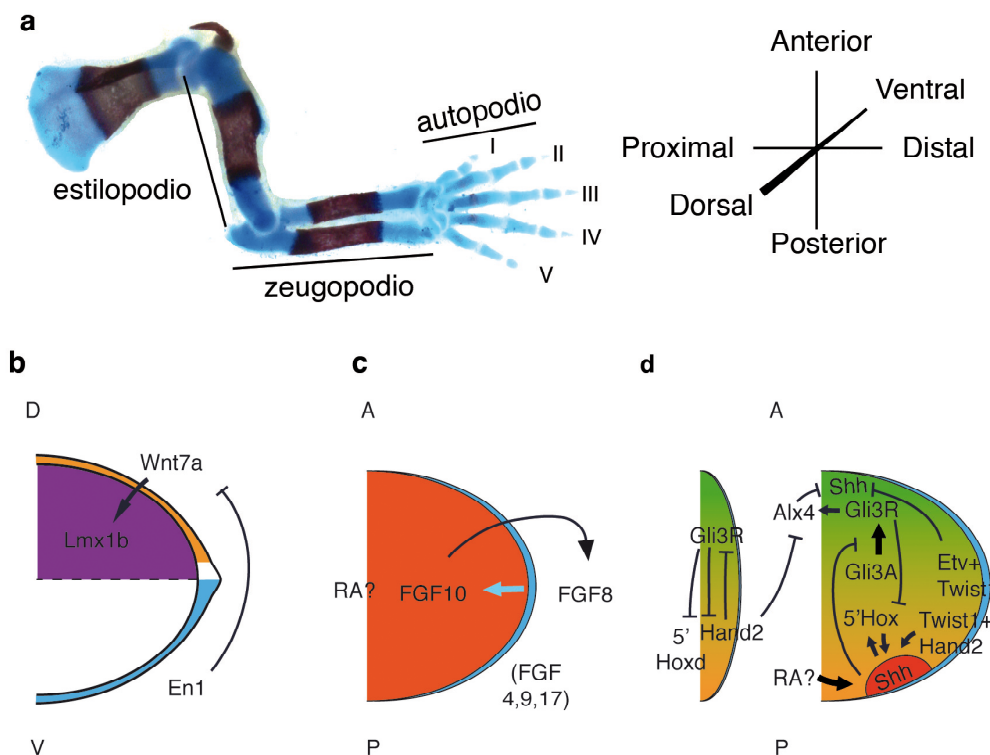
La formación de patrón a lo largo del eje D-V depende de la comunicación entre mesénquima y ectodermo (Fig. I3b). Antes de la inducción del primordio de extremidad, la información D-V, heredada del tronco, reside en el mesénquima que dará lugar al primordio (Geduspan y MacCabe, 1986,1989). Se ha demostrado que los somitos ejercen una influencia dorsalizante, mientras que la región lateral de la somatopleura ejerce una influencia ventralizante (Michaud *et al.*, 1997). En esos estadios tempranos, esa información puede reprogramar al ectodermo que cubre el mesénquima; pero una vez que se ha producido la inducción, la información reside en el ectodermo, que es entonces capaz de reprogramar el mesénquima de la extremidad (Geduspan y MacCabe, 1989). A partir de ese momento, el ectodermo dorsal del primordio de la extremidad produce el factor difusible WNT7A (Dealy *et al.*, 1993; Parr *et al.*, 1993; Altabef y Tickle, 2002), que no se expresa en el ectodermo ventral debido a que éste expresa *Engrailed-1* (*En-1*), que reprime su expresión y confiere carácter ventral (Loomis *et al.*, 1996; Cygan *et al.*, 1997; Logan *et al.*, 1997). *En-1* por su parte es inducido en el ectodermo ventral por señalización del tipo BMP (Ahn *et al.*, 2001; Pizette *et al.*, 2001). WNT7A señala al mesodermo dorsal, donde induce al factor de transcripción *Lmx1b*, que está relacionado con la identidad dorsal del mesénquima, ya que el mutante de falta de función presente extremidades biventrales, y su expresión ectópica provoca dorsalización del mesénquima ventral (Riddle *et al.*, 1995; Vogel *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1998; Qiu *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010). Resulta interesante que a partir de cierto momento del desarrollo, las mitades dorsal y ventral de la extremidad se comportan como compartimentos distintos, es decir, que sus linajes no se mezclan sino que establecen un límite abrupto (Arques *et al.*, 2007; Pearse *et al.*, 2007; Qiu *et al.*, 2009). Para el establecimiento de dichos compartimentos es necesaria la función de *Lmx1b* (Arques, 2007; Qiu *et al.*, 2009).

Tras el establecimiento del primordio de extremidad, la mayor parte del crecimiento se produce a lo largo del eje P-D. Los procesos de formación de patrón y diferenciación ocurren a la vez que dicho crecimiento, por lo que este eje resulta particularmente interesante para estudiar estos procesos cuando, no sólo el espacio, sino también el tiempo, juegan un papel importante. El eje P-D depende mayoritariamente de un centro de señalización conocido como cresta ectodérmica apical (*apical ectodermal ridge*, AER, en inglés), que discurre a lo largo del eje D-V en el extremo distal del primordio de extremidad. Se trata de un epitelio especializado, pseudoestratificado en el pollo y poliestratificado en el ratón (el resto del epitelio que cubre la extremidad es cuboidal) (Fernandez-Teran y Ros, 2008), que sufre una serie de cambios morfogénéticos a lo largo de su período activo (inducción, compactación o maduración, mantenimiento y regresión) (Todt y Fallon, 1984,1986; Wanek *et al.*, 1989). El establecimiento del límite D-V (ya comentado) está íntimamente relacionado con el posicionamiento del AER, y de hecho ambos procesos comparten algunos mecanismos. Así, la vía de BMP, que a través de *En-1* controla la formación de patrón D-V, también participa en la inducción del AER (Ahn *et al.*, 2001; Pizette *et al.*, 2001), a través, en parte, de  $\beta$ -catenina (Soshnikova *et al.*, 2003). Más adelante se comentará en detalle el papel del AER, pero por el momento bastará con mencionar que una de sus funciones principales es la producción de FGFs, siendo el principal FGF8. Estas señales llegan al mesénquima subyacente, manteniendo su estado indiferenciado y proliferativo. Como ya se ha mencionado, el mesénquima responde, en el contexto de una retroalimentación positiva, produciendo FGF10, que a su vez es necesario para el mantenimiento del AER (Fig. I3c).

Otra señal con gran importancia en el eje P-D es el ácido retinoico (RA), producido por el flanco del embrión, en el extremo proximal de la extremidad. En base a los trabajos de la literatura y a los resultados que se expondrán en esta tesis, sería argumentable la posibilidad de incluir la región productora de RA dentro de la categoría de centro de señalización en la extremidad.

## I. INTRODUCCIÓN

En cuanto al eje A-P, se distinguen al menos dos fases en el proceso de formación de patrón. La segunda es la más estudiada, ya que involucra un centro de señalización clave que se conoce como zona de actividad polarizante (ZPA en inglés). Sin embargo, antes de la aparición de la ZPA, se produce un pre-patrón independiente de ésta, y que de hecho ayuda a su regionalización correcta. Dicho pre-patrón depende, entre otras cosas, del mutuo antagonismo que se establece entre la expresión de *Gli3* (mediada por la forma represora Gli3R) y la del factor bHLH *Hand2* (Fig. I3d, izquierda) (te Welscher *et al.*, 2002a; Galli *et al.*, 2010).



**Figura I3.** Ejes y centros de señalización de la extremidad de vertebrado. **a**, Tinción de cartílago (azul) y hueso (rojo) de una extremidad de ratón de E16.5. Se indica el nombre de los 3 segmentos principales, y en números romanos la identidad de los dedos. El diagrama de coordenadas indica la polaridad de los 3 ejes. **b**, resumen de las interacciones implicadas en la formación de patrón D-V, una vez que la información clave reside en el ectodermo de la extremidad. D y V indican los bordes Dorsal y Ventral, respectivamente. *Wnt7a* (naranja), se expresa sólo en el ectodermo dorsal, ya que es reprimido por *En-1* (azul), expresado en el ectodermo ventral (y dependiente a su vez de señalización BMP). *Wnt7a* señala al mesénquima dorsal, induciendo la expresión de *Lmx1b*, que tiene un efecto dorsalizante. **c**, esquema resumen de las interacciones importantes en el eje P-D. Los FGFs producidos por el AER (FGF4, 9 y 17 tienen un papel secundario y se producen desde la región posterior del AER (Mariani *et al.*, 2008)) señalizan al mesénquima subapical y mantienen sus propiedades características, induciendo la producción de FGF10, que a su vez señala al ectodermo para mantener el AER. Como se verá más adelante, RA producido en la región proximal también juega un papel relevante en este eje. A y P indican los extremos anterior y posterior del primordio, respectivamente. **d**, Resumen de las dos etapas de interacciones importantes en el establecimiento del eje A-P. Inicialmente, el antagonismo entre GLI3R (verde) por un lado y HAND2 y los factores 5' HOXD (anaranjado) por otro, dan lugar a un prepatrón que regionaliza el primordio y restringe la localización de la ZPA (te Welscher *et al.*, 2002a; te Welscher *et al.*, 2002b; Zakany *et al.*, 2004). RA podría estar implicado tempranamente en dicha localización, aunque se han publicado resultados contradictorios (Helms *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2009). En una segunda fase, *Shh* ya se expresa en la ZPA, y una de sus principales acciones es evitar el procesamiento de la forma completa de GLI3 (GLI3A) a la forma represora (GLI3R). La red de interacciones que mantiene la expresión de *Shh* restringida a la zona posterior es muy compleja, e involucra factores con efecto negativo en su expresión, como ALX4 (Qu *et al.*, 1997) o los factores ETv4/5, dianas de FGF (Mao *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009); así como factores con efecto positivo, como los genes 5' *HoxA/D* (Zakany *et al.*, 2004; Kmita *et al.*, 2005; Tarchini *et al.*, 2006), HAND2 (Charite *et al.*, 2000; Galli *et al.*, 2010), y también TWIST1 (positivo o negativo según su compañero molecular (Krawchuk *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010b))

La ZPA consiste en una región del mesénquima de la extremidad, localizada en la zona posterior, estrictamente delimitada por una plétora de factores distintos (Fig. I3d, derecha, en rojo. Ver leyenda). Esta región, cuando se transplanta a la zona anterior de la extremidad, tiene la sorprendente capacidad de inducir la formación de elementos supernumerarios (a veces en zeugopodio, pero sobre todo en autopodio), especularmente simétricos respecto al patrón normal (Saunders y Gasseling, 1968) (Fig. I4a). De lo más destacable es que los elementos ectópicos que se forman no derivan del propio trasplante, sino de una región amplia del tejido receptor (Honig, 1981). Al principio se barajaron dos tipos de explicaciones: 1) algún tipo de señal producida por el trasplante estaba reespecificando el tejido hospedador. Se llegó a postular que dicha señal era un morfógeno en sentido clásico, es decir, que su gradiente de concentración de posterior a anterior era interpretado por las células del primordio de modo que las que “sentían” concentraciones por encima de cierto límite daban lugar a un dedo concreto, y las que estaban expuestas a otro rango daban lugar a otro dedo distinto (Wolpert, 1969; Tickle *et al.*, 1975). 2) Estaba operando un mecanismo de intercalación, que reemplazaba los destinos que faltaban entre el trasplante (carácter posterior) y el tejido receptor (carácter anterior) (Iten y Murphy, 1980). La primera hipótesis acabó prevaleciendo tras experimentos en los que el trasplante de dos ZPAs no daba lugar a la formación de dedos anteriores (Wolpert y Hornbruch, 1981) y otros en que se vio que el efecto de las células polarizantes era dependiente de dosis. Así, existe una correlación entre el número de células transplantadas y la identidad del dedo adyacente al trasplante (Tickle, 1981). Además, RA, aplicado exógenamente en el margen anterior del primordio, también provocaba duplicaciones en espejo (Tickle *et al.*, 1982; Summerbell, 1983; Summerbell y Harvey, 1983), lo que lo convirtió en el candidato más firme para ser ese morfógeno. Sin embargo, RA se acabó descartando, porque nunca se encontraron evidencias demasiado convincentes de la existencia de una gradiente de RA a lo largo del eje A-P, y de hecho el efecto de RA era inducir otra zona polarizante, no ejercer su función (Noji *et al.*, 1991; Wanek *et al.*, 1991). Años más tarde, se descubrió que la ZPA producía una molécula llamada Sonic Hedgehog (SHH, homólogo de *hedgehog* de *Drosophila*), responsable de todos los efectos de esta región (incluyendo el dependiente de dosis), y capaz de reemplazarla (Riddle *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1997). De hecho, el mutante de *Shh* presenta una extremidad muy reducida, en la que faltan un elemento del zeugopodio y casi todos los dedos, excepto el 1 (que es independiente de SHH y se forma sobre todo en la extremidad inferior del mutante (Chiang *et al.*, 1996; Chiang *et al.*, 2001; Kraus *et al.*, 2001)). No obstante, pronto resultó evidente que SHH no se comportaba como un morfógeno al uso, ya que un gradiente lineal de actividad no era necesario para el establecimiento de un patrón normal (Yang *et al.*, 1997; Ahn y Joyner, 2004). Así, se fueron proponiendo modelos más sofisticados para explicar su actividad (Fig. I4b – e, ver leyenda). No obstante, la asignación de identidad a los dedos no acaba con SHH. Se ha descrito que en estadios avanzados, cuando ya no se expresa *Shh*, la región que va a dar lugar a las falanges (*phalanx forming region*, PFR en inglés) es todavía susceptible de cambiar su identidad A-P, y es el interdígito inmediatamente posterior a cada dedo el que produce las señales instructivas (Dahn y Fallon, 2000; Suzuki *et al.*, 2008).

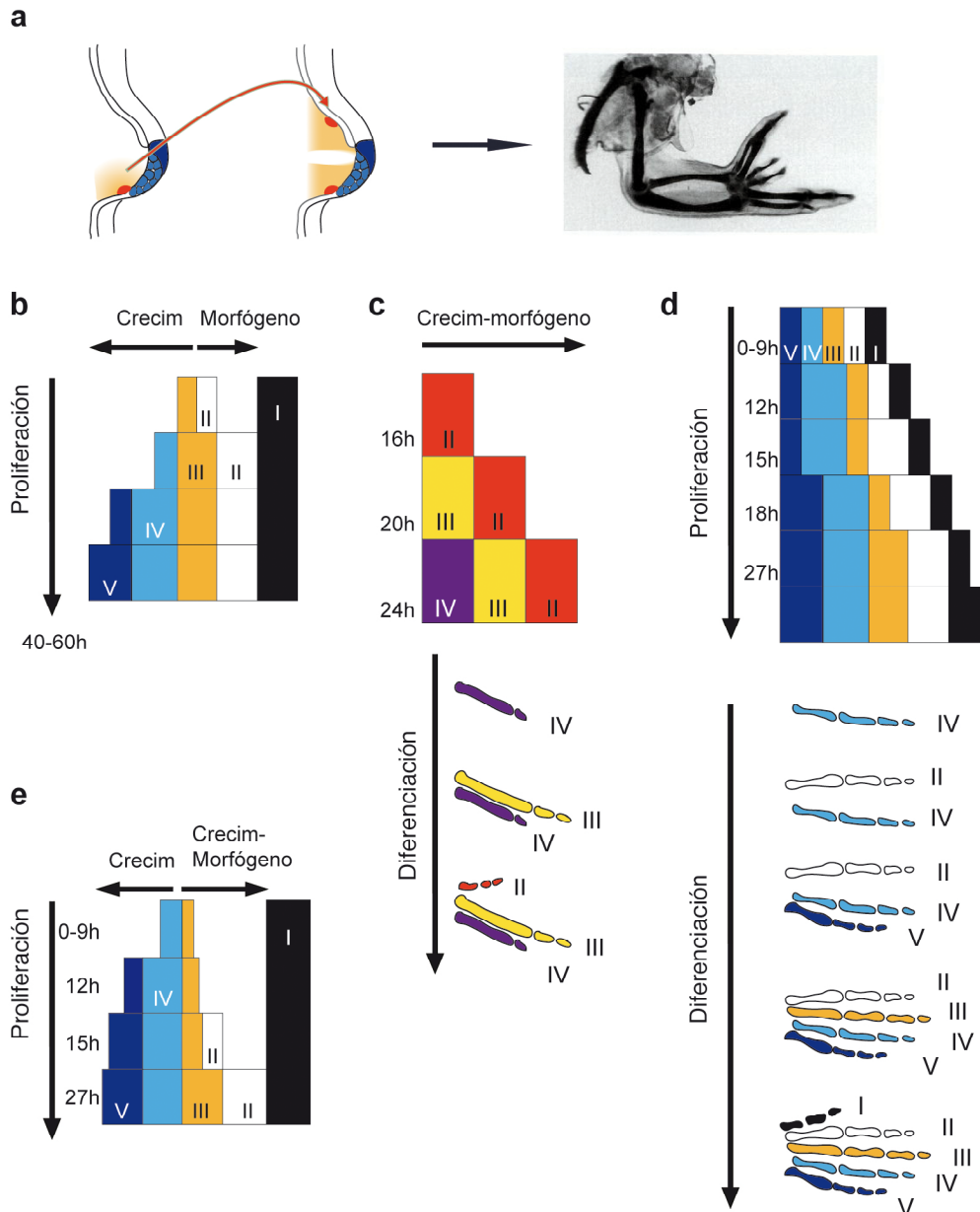
La señalización por los homólogos de *hedgehog* (*Shh* e *lhh*, por ejemplo) está mediada por factores *Gli*, homólogos de *cubitus interruptus* (*Ci*) de *Drosophila*. *Gli1*, *Gli2* y *Gli3* se expresan en la extremidad, pero ni el mutante de *Gli1*, ni el de *Gli2*, ni la mutación combinada de ambos tienen apenas fenotipo en la extremidad (Park *et al.*, 2000; Bai *et al.*, 2002). La función fundamental es realizada por GLI3, que en ausencia de señalización Hedgehog se procesa para convertirse en un fuerte represor transcripcional (GLI3R) (Wang *et al.*, 2000). Debido a la distribución de SHH en la extremidad, se produce un gradiente de GLI3R de anterior a posterior, que tiene un papel fundamental en la formación del patrón A-P. El gradiente se hace muy abrupto hacia la zona posterior, porque SHH además reprime transcripcionalmente *Gli3*

## I. INTRODUCCIÓN

(Schweitzer *et al.*, 2000). El mutante de falta de función de *Gli3* se caracteriza por polidactilia y una casi total pérdida de identidad de los dedos (Hui y Joyner, 1993), fenotipo que no se ve alterado por la pérdida simultánea de *Shh* (Litington *et al.*, 2002; te Welscher *et al.*, 2002b). Respecto a si la forma sin procesar (GLI3FL o GLI3A) tiene alguna función, las conclusiones parecen ser contradictorias. Así, aunque inicialmente se propuso que lo importante para la formación de patrón A-P es la relación GLI3R/GLI3FL (Litington *et al.*, 2002; te Welscher *et al.*, 2002b; Wang *et al.*, 2007), finalmente, tras varias manipulaciones genéticas que implican versiones truncadas de GLI3 que se comportan en algunos aspectos como GLI3R, se ha propuesto que sólo la forma represora, y no la versión sin procesar, es la que ejerce su función de formación de patrón en la extremidad (Hill *et al.*, 2009). Este último trabajo, además, puso de manifiesto la posible existencia de un patrón primordial A-P en la extremidad, anterior incluso al pre-patrón debido al antagonismo GLI3-HAND2. Dicho patrón prototipo, como fue llamado, sería por tanto independiente de SHH y de GLI3, y se ve reflejado en la distribución asimétrica del transcrito de *Gli3* incluso en situaciones en que la actividad de SHH y GLI3 es muy baja o ausente (Hill *et al.*, 2009).

**Figura I4 (página siguiente).** Modelos de formación de patrón A-P. **a**, El trasplante de la ZPA (rojo) a la región anterior provoca una duplicación en espejo del eje A-P. Foto de *Developmental Biology*. Gilbert. **b – e**, Distintos modelos de formación de patrón A-P. La representación gráfica está basada en (Towers y Tickle, 2009). Los números romanos indican las identidades de los dígitos. Los rectángulos indican los primordios de los dedos, y su anchura cómo se van expandiendo con el tiempo. En el eje vertical se indica el proceso que ocurre con el tiempo, y en el eje horizontal se distingue si sólo está habiendo crecimiento, o señalización de SHH a distancia (morfógeno), o una combinación. **b**, Modelo de gradiente temporal basado en la expansión (Harfe *et al.*, 2004). En ratón, los dedos 4 y 5 derivan completamente de las células de la ZPA, y el 3 tiene cierta contribución. Las células del dedo 2 y el resto de las del dedo 3 son aquellas que reciben señalización de SHH a larga distancia. La principal diferencia entre las células de los dedos 3, 4 y 5 que derivan de la ZPA es el tiempo de exposición a SHH, y entre las células de los dedos 2 y 3 que no provienen de la ZPA es la concentración de SHH. **c**, En el ala de pollo se ha demostrado que el crecimiento (expansión) provocado por SHH es una parte fundamental de la formación de patrón, porque va alejando a las células de la zona posterior, donde se produce una promoción progresiva desde destinos anteriores a posteriores (Tickle, 1995; Towers *et al.*, 2008). De esta manera, si se inhibe la señalización de SHH, no hay expansión ni continúa la promoción, por lo que sólo se forman dedos anteriores (Scherz *et al.*, 2007; Towers *et al.*, 2008). Por el contrario, si se inhibe el crecimiento pero no la señalización de SHH, las células no pueden salir de la zona de promoción, por lo que sólo se forma el dedo(s) más posterior(es) (Towers *et al.*, 2008). **d**, Modelo bifásico de especificación-expansión (Zhu *et al.*, 2008). La eliminación de *Shh* en distintos momentos del desarrollo de ratón y la caracterización detallada de la identidad de los dedos formados mostró que conforme *Shh* se elimina más y más tarde, los dedos que se forman (aparte del 1, independiente de *Shh*) son 4, 2, 5, 3. Es decir, que los dedos posteriores no son los que más tiempo de exposición a SHH necesitan, puesto que correspondería al dedo 3. Es destacable que el orden condrogénico observado no coincide con el descrito para un gran número de tetrápodos (Shubin y Alberch, 1986). Esto condujo a un modelo en el que las funciones de SHH para la especificación de identidad y expansión de los primordios de los dedos estarían desacopladas, ocurriendo la primera de ellas muy temprano, y la segunda a continuación. Si la exposición a SHH se interrumpe antes de que el primordio se haya expandido lo suficiente, el dedo en cuestión no se formará durante la fase de diferenciación (Zhu *et al.*, 2008). **e**, Intento de reconciliación de los modelos anteriores, propuesto en (Towers y Tickle, 2009). El modelo alterna un mecanismo de crecimiento-morfógeno como el de ala de pollo (Towers *et al.*, 2008) para los dedos 2 y 3 de ratón, con un mecanismo de expansión y promoción temporal para los dedos 4 y 5 (Harfe *et al.*, 2004). La dinámica de ambos procesos independientes da lugar a que el proceso de diferenciación de los dedos ocurra en el orden observado en (Zhu *et al.*, 2008).





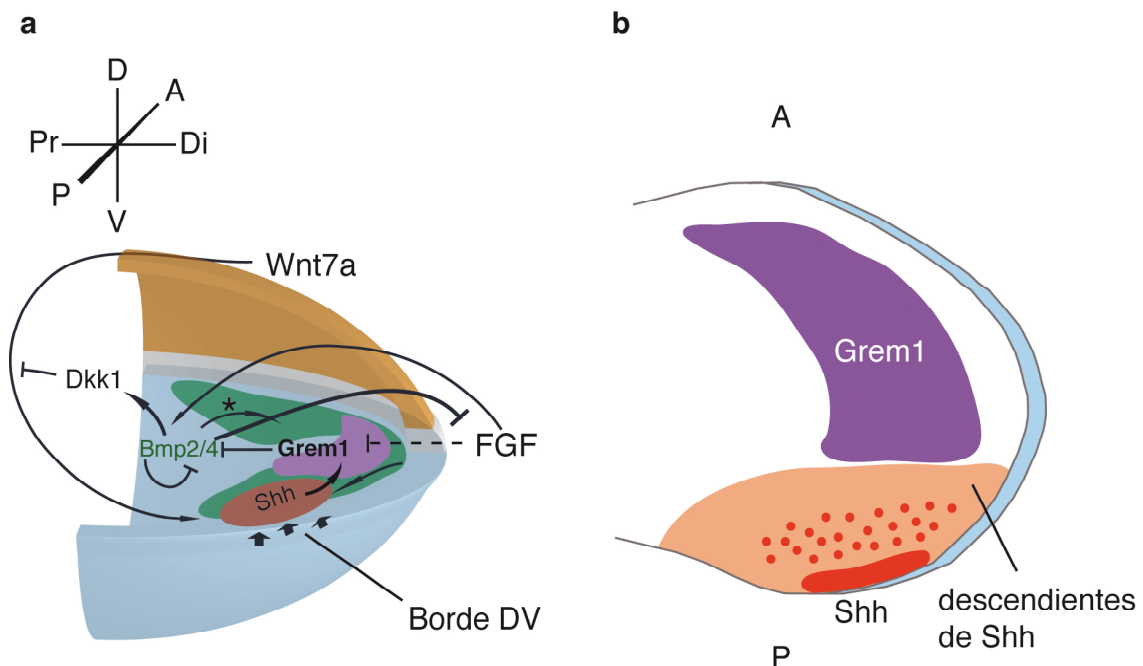
Si bien *GLI3R* podría ejercer todos los efectos en cuanto a la formación de patrón A-P, no es así con respecto al número de dedos (Hill *et al.*, 2009). En este aspecto también participan los genes *5' Hox*. Si bien está claro que los genes *Hox* son necesarios para la morfogénesis de los dedos (revisado en (Zakany y Duboule, 1999)), no lo está tanto que sólo tengan un efecto positivo en el número de dedos. En el mutante de falta de función de *Gli3*, los *5' Hoxd* se expresan ectópicamente en la parte anterior del primordio de extremidad (Zuniga y Zeller, 1999; Litingtung *et al.*, 2002; te Welscher *et al.*, 2002b); pero contrariamente a lo esperado, su eliminación no rescata el número de dedos, sino que lo incrementa (Sheth *et al.*, 2007). Este sorprendente fenotipo todavía no se entiende totalmente (ya que la eliminación de *Gli3* exclusivamente o en combinación con la de todo el *cluster HoxD* da lugar al mismo número de dedos (Zakany *et al.*, 2007)), aunque sin duda conducirá a resultados interesantes.

### I.2.4 Interacción entre los distintos centros de señalización y control del tamaño de la extremidad.

Pese a la comodidad de dividir la extremidad en 3 ejes, dependiendo cada uno de un centro de señalización, es evidente que la realidad no es tan sencilla. Los 3 centros de señalización, a través de las moléculas que producen, interaccionan directa o indirectamente entre sí. De este modo el crecimiento de la extremidad es coordinado y muy robusto, ya que una alteración en algún punto puede ser tamponada por la compleja red de interacciones operantes. El punto principal de interacción reside en la relación entre *Shh* y el mantenimiento del AER (Fig. I5). Uno de los primeros ejemplos que se describió fue un bucle de retroalimentación entre *Shh* y *Fgf4* (Laufer *et al.*, 1994; Niswander *et al.*, 1994). No obstante, años más tarde se comprobó que en realidad, más que FGF4 exclusivamente, lo que se requería para el mantenimiento de *Shh* era una suficiente señalización FGF, que puede ser proporcionada por FGF8 exclusivamente, al menos en el embrión de ratón (Moon *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2000; Mariani *et al.*, 2008). En este conjunto de interacciones resulta importante cualquier señal requerida para la expresión de *Shh*, como WNT7A señalizando desde el ectodermo dorsal (Yang y Niswander, 1995). Siguiendo con el ectodermo no AER, también se ha descrito que el borde D-V del ectodermo, a través de *Tbx2*, también resulta fundamental para la expresión de *Shh*, explicando su restricción a la proximidad del ectodermo (Nissim *et al.*, 2007) (Fig. I5a). Además, el propio SHH regula sus niveles de expresión induciendo apoptosis en las células posteriores que tienen demasiada señalización Hedgehog (Sanz-Ezquerro y Tickle, 2000). Muy recientemente se ha descubierto que las BMPs también juegan un papel importante en dicha restricción, a través de un bucle de retroalimentación negativa con *Shh* (SHH induce expresión de BMPs, pero éstas a su vez inhiben *Shh* porque interfieren con el efecto positivo de la señalización FGF y Wnt) (Bastida *et al.*, 2009).

Pero sin duda, las interacciones más estudiadas pertenecen a los llamados bucle Shh-Grem-Fgf y bucle Fgf-Grem (Fig. I5a). Como se puede apreciar, el protagonista de ambos es el gen *Gremlin1* (*Grem1*). A finales del siglo pasado, en un *screening* de expresión diferencial entre extremidades silvestres y extremidades del mutante *limb deformity* (ld, capaz de activar *Shh* pero no de mantener su expresión), se descubrió *Grem1* como uno de los genes de expresión alterada (Zuniga *et al.*, 1999). Es importante destacar que la señalización BMP, si bien es necesaria inicialmente a niveles bajos para la inducción del AER (Ahn *et al.*, 2001), más adelante resulta perniciosa para el mantenimiento de dicha estructura (Pizette y Niswander, 1999; Benazet *et al.*, 2009). GREMLIN1, por su parte, es una proteína secretada capaz de unir y bloquear los factores BMP, y es precisamente a través de dicha función que actúa de relé (*relay*) entre la señalización de SHH (que induce la expresión de *Grem1* a través de factores BMP (Nissim *et al.*, 2006; Benazet *et al.*, 2009)) y el mantenimiento del AER (Capdevila *et al.*, 1999; Merino *et al.*, 1999; Zuniga *et al.*, 1999; Khokha *et al.*, 2003). Como ya se ha comentado, los FGFs producidos por el AER mantienen a su vez la expresión de *Shh* en la región posterior, cerrando el bucle Shh-Grem-Fgf. Otro papel de los FGFs es participar en un bucle de retroalimentación negativa (Fgf-Grem). Si bien inicialmente existe una relación positiva entre GREM1 (que mantiene el AER) y los FGFs (que mantienen GREM1 a través de SHH), recientemente se ha descubierto que conforme la actividad de FGFs va aumentando en el AER a través de esa relación positiva, acaba predominando un efecto negativo de dichos factores sobre la expresión posterior de *Grem1*, que hace que su dominio de expresión se aleje cada vez más del AER (Verheyden y Sun, 2008). Cuando la fuente de GREM1 queda demasiado lejos del AER, ya no puede bloquear el efecto negativo de las BMPs sobre dicha estructura, de forma que ésta degenera (la primera indicación es la pérdida de expresión de *Fgf4*), y se detiene el proceso de crecimiento y formación de patrón en la extremidad (Verheyden y Sun, 2008; Benazet y

Zeller, 2009) (Fig. I5a). Otro mecanismo de auto-terminación ha sido descrito en la extremidad de pollo, y está basado en el sorprendente descubrimiento de que los descendientes de las células que alguna vez expresaron *Shh* no son capaces de activar *Grem1* (Scherz *et al.*, 2004). Así, debido a la expansión de los descendientes de la ZPA, las células capaces de activar *Grem1* en respuesta a SHH se alejan cada vez más de ese centro de señalización, hasta que llega un momento en que la distancia es demasiado grande para que se produzca esa respuesta. Es entonces cuando *Grem1* deja de expresarse y las BMPs causan la regresión del AER, terminándose el bucle y el crecimiento de la extremidad (Scherz *et al.*, 2004) (Fig. I5b). Es destacable que este mecanismo no parece ser muy probable en la extremidad de ratón, ya que el orden de los acontecimientos no se corresponde con el que se acaba de describir. Es más, se ha propuesto que el bucle negativo Fgf-Grem sería capaz de explicar dicho orden tanto en pollo como en ratón (Verheyden y Sun, 2008).



**Figura I5.** Interacción entre los centros de señalización y terminación del crecimiento en la extremidad. **a**, Representación pseudo-tridimensional de un primordio de extremidad y algunas de las interacciones entre los distintos centros de señalización y sus mediadores. Las flechas indican activación, y las líneas en forma de T inhibición. El dominio verde se refiere sobre todo a la expresión de *Bmp2* ó *Bmp4*, según se trate de pollo o de ratón, respectivamente. La línea discontinua indica que dicha interacción no juega un papel importante desde el principio, sino más adelante (bucle Fgf-Grem, ver texto principal). **b**, Modelo de terminación del bucle Shh-Grem-Fgf debido a la expansión de los descendientes de la ZPA. Cuando los descendientes de la ZPA (en naranja pálido), que no pueden activar *Grem1*, ocupan una región mayor que la del alcance efectivo de SHH (en rojo), la expresión de *Grem1* cesa, y con ella el bucle y el crecimiento de la extremidad.

A, P, Pr, Di, D, V = Anterior, posterior, proximal, distal, dorsal y ventral, respectivamente.

### I.2.5 El eje próximo-distal de la extremidad.

Como ya se ha mencionado, el eje P-D de la extremidad resulta especialmente interesante, porque en él la formación de patrón debe ocurrir junto con el crecimiento. Esto es algo que también ocurre en el eje A-P, pero es innegable que el crecimiento a lo largo del eje P-D es mucho más marcado que en el eje A-P. Por tanto, entender cómo pueden operar los mecanismos de formación de patrón en un territorio tan cambiante se presenta como un reto especialmente complejo, como lo atestigua el hecho de que durante los últimos 40 años no se haya llegado a un modelo que explique todos los resultados experimentales. En lo que resta de



## I. INTRODUCCIÓN

Introducción, las principales cuestiones sin resolver aparecerán resaltadas en ***negrita cursiva***. Comprensiblemente, abordar algunas de estas cuestiones es el objetivo principal de esta tesis.

### I.2.5.1 Interacciones epitelio-mesénquima.

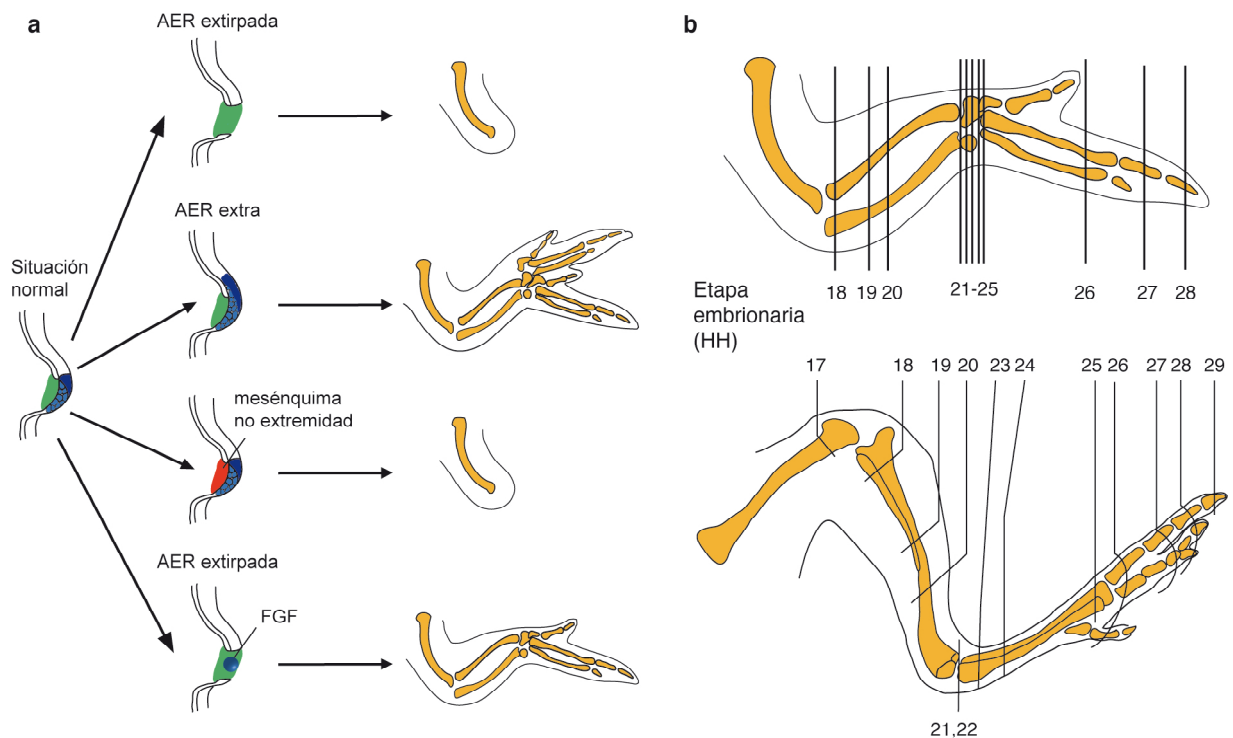
El papel fundamental del AER se pone de manifiesto cuando se elimina a través de cirugía o métodos genéticos (Saunders, 1948; Rowe y Fallon, 1982; Barrow *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2008; Yu y Ornitz, 2008). Desprovisto de AER, un primordio de extremidad da lugar a un miembro truncado, en el que faltan varios elementos distales. El momento de eliminación del AER es importante. Si se elimina muy pronto, sólo se forma parte del elemento proximal. Si se elimina más tarde, llegan a formarse parte de los elementos del zeugopodio, y si se elimina aún más tarde, lo único que no se forma son los dedos (Fig. I6a y b). La extirpación del AER tiene dos efectos principales. Si se elimina en estadios tempranos, el mesénquima subapical (150 – 200 micras bajo el AER) experimenta una alta tasa de muerte por apoptosis (durante las primeras 10 horas en pollo y con algo más de retraso en ratón) (Janners y Searls, 1971; Rowe *et al.*, 1982; Dudley *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2002; Barrow *et al.*, 2003; Yu y Ornitz, 2008). Este efecto es menos extenso si la eliminación ocurre algo más tarde (estadio de Hamilton Hamburger (HH) 23-24 en pollo (Hamburger, 1951)) y completamente ausente a partir de entonces (Rowe *et al.*, 1982; Dudley *et al.*, 2002). Es destacable que no todos los estudios de eliminación genética coinciden en lo referente a este efecto, ya que algunos afirman que no se produce (Lu *et al.*, 2008). El otro efecto consiste en una disminución de la tasa proliferativa en el mesénquima distal, que es especialmente evidente a partir de las 8-10 horas tras la operación, sobre todo en la extremidad de pollo (Summerbell, 1977b; Dudley *et al.*, 2002). Este efecto tiene una repercusión particularmente importante en estadios avanzados, en los que no se produce muerte celular (Dudley *et al.*, 2002). En la extremidad de ratón, de nuevo hay discrepancias entre los estudios que afirman que este efecto se produce (Yu y Ornitz, 2008) y los que afirman que no (Barrow *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2008). Incluso en pollo este efecto es más discutido, quizá porque al tardar más en aparecer (Summerbell, 1977b; Dudley *et al.*, 2002), en estadios tempranos queda eclipsado por la alta tasa de muerte. Algunos trabajos clásicos de hecho niegan que este efecto se produjera (Janners y Searls, 1971), pero la disponibilidad de técnicas más fiables en la actualidad deja lugar a pocas dudas.

Otras características del AER aparecen resumidas en la Figura I6a:

- No sólo es necesaria para el crecimiento de la extremidad, sino suficiente para inducirlo si se transplanta a una región competente (Zwilling, 1956).
- Sólo el mesénquima de la extremidad es capaz de mantener una cresta activa. Si se transplanta mesénquima que no es de la extremidad bajo el AER, éste degenera y la extremidad se trunca (Rubin y Saunders, 1972). Además, el mesénquima de la extremidad de pollo es capaz de mantener un AER de ratón, dando lugar a una extremidad de pollo (Kuhlman y Niswander, 1997).
- Si se extirpa el AER y se implanta en el mesénquima distal una microesfera impregnada en FGF, el desarrollo se rescata y se forma una extremidad bastante normal (Niswander *et al.*, 1993; Fallon *et al.*, 1994). Pese a que esto parece indicar que los FGFs pueden sustituir todas las funciones del AER, lo cierto es que la eliminación de los FGFs del AER no provoca los mismos efectos que la eliminación de la propia cresta (ver más adelante). Esto sugiere que otras moléculas producidas por el AER, como Wnt o BMPs, podrían tener papeles importantes. De hecho, recientemente se ha producido un avance importante a este respecto (ten Berge *et al.*, 2008). Por separado, los factores Wnt (producidos por el ectodermo de la extremidad en

general) inhiben la condrogénesis, estimulando la diferenciación hacia tejido conectivo, y promueven proliferación a corta distancia, mientras que los FGFs (producidos por el AER) retrasan pero no impiden la diferenciación hacia condrocitos, y no inducen proliferación. Sin embargo, cuando se combinan, se produce un efecto sinérgico: las células se mantienen en un estado indiferenciado, conservando todo su potencial de diferenciación, y altamente proliferativo (más que con Wnt en solitario). Esta relación sinérgica, unida a la regionalización de las señales, y al crecimiento de la extremidad (tanto en longitud como en diámetro), es la responsable de que la zona bajo el AER se mantenga indiferenciada, que en el centro de la extremidad se formen las condensaciones cartilaginosas, y que rodeando a éstas se forme el tejido conectivo (ten Berge *et al.*, 2008).

A pesar de estos últimos avances, ya se ha mencionado que sigue habiendo trabajos (en uno de ellos se elimina directamente la función de *Wnt3*) que niegan que la pérdida del AER cause un descenso de proliferación (Barrow *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2008), por lo que **el papel exacto del AER y las señales que produce en todos estos procesos sigue siendo una cuestión candente.**



**Figura 16.** Propiedades del AER. **a**, Resumen de las principales interacciones descubiertas entre el mesénquima y el AER. Modificado de *Developmental Biology*. Gilbert. **b**, Resumen de las estructuras formadas tras la eliminación del AER en distintos momentos del desarrollo, tanto en ala (arriba), como en pata (abajo).

#### 1.2.5.2 La información posicional reside en el mesénquima.

Como se acaba de explicar, el ectodermo de la extremidad, concretamente el AER, tiene una importancia fundamental para su desarrollo y crecimiento P-D. Esto condujo a la pregunta de si la información posicional a lo largo de este eje residía en el mesénquima o en el AER. Aunque algunos experimentos clásicos sugerían que el mesénquima proximal podía tener alguna influencia sobre el mesénquima distal (Wolff y Hampe, 1954; Hampe, 1959; Kieny, 1964a, 1964b), el experimento definitivo consistió en el intercambio del AER entre primordios en distintos estadios de desarrollo. Así se pudo comprobar que, independiente de la edad del

## I. INTRODUCCIÓN

AER, el desarrollo de la extremidad proseguía con normalidad, sin dar lugar a deficiencias o duplicaciones en tándem (Rubin y Saunders, 1972). Esto indicaba que la información posicional residía en el mesénquima, mientras que el AER sólo tenía un papel permisivo.

Como suele ocurrir, los descubrimientos recientes obligan a matizar la anterior afirmación. Ahora se sabe que los FGFs producidos por el AER no sólo son permisivos para el crecimiento, sino que otorgan carácter distal al mesénquima subyacente, en lo que podría considerarse un papel instructivo (Mercader *et al.*, 2000; Mariani *et al.*, 2008). No obstante, **se desconoce si ese efecto instructivo es cualitativa y cuantitativamente constante o por el contrario varía con el tiempo** (ver Discusión).

### I.2.5.3 Marcadores P-D.

Ya se ha comentado que, en estadios avanzados, el eje P-D de la extremidad se puede dividir anatómicamente en tres segmentos. No obstante, cabe la pregunta de si, durante el desarrollo del primordio, estos segmentos son distinguibles entre sí en base a una expresión génica diferencial. Es importante hacer notar que no todos los genes expresados diferencialmente tienen que ser responsables de la especificación hacia uno u otro destino, sino que pueden reflejar ese estado de especificación actuando, tal vez, como sus mediadores a nivel celular. Ya sean causantes o mediadores, la identificación inequívoca de los llamados marcadores próximo-distales ha resultado ser una tarea complicada.

Los principales candidatos para este puesto son sin duda factores *Homeobox*, especialmente los genes *Hox*, por extrapolación de su remarcable capacidad para especificar la identidad de segmentos concretos del cuerpo de invertebrados (revisado en (Gehring y Hiromi, 1986)) o tipos vertebrales en los vertebrados (revisado en (Stern *et al.*, 2006)). En el primordio de extremidad se expresan miembros de los cuatro *clusters* de genes *Hox* que existen en vertebrados (Nelson *et al.*, 1996)(Fig. I7a), aunque mayoritariamente (y con el mismo patrón en la extremidad superior e inferior) de los *clusters* A y D (Yokouchi *et al.*, 1991; Haack y Gruss, 1993; Nelson *et al.*, 1996). Sólo algunos genes de los *clusters* B y C se expresan en la extremidad, y además con variaciones entre la extremidad superior e inferior (Nelson *et al.*, 1996).

La expresión de los genes *Hoxd* es compleja y muy dinámica, con dos o incluso tres fases temporales distintas (según quién lo describa (Dolle *et al.*, 1989a; Izpisua-Belmonte *et al.*, 1991; Nelson *et al.*, 1996)), que dependen de diferentes regiones de control global de expresión (resumido en (Tarchini y Duboule, 2006)). La región ELCR, localizada hacia el extremo telomérico (3') del *cluster*, controla tempranamente lo que se conoce como expresión temporal colinear, de forma que los genes más cercanos a esta región se expresan antes, y los más lejanos se expresan más tarde. A su vez, durante estas etapas tempranas (que conciernen a la expresión en los precursores de estilopodio y zeugopodio), la región POST, hacia el extremo centromérico (5') del *cluster*, se encarga de la restricción espacial, de forma que los genes más cercanos a dicha región tienen un patrón de expresión más restringido hacia la región posterior del primordio de extremidad (colinearidad espacial). En la última fase, la que concierne a la expresión en los precursores de autopodio, la región genómica que controla la expresión se llama GCR y está localizada todavía más hacia el extremo centromérico del brazo cromosómico. Esta región es responsable de la llamada colinearidad espacial invertida en el autopodio, ya que los genes más cercanos a esta región genómica son las que tienen un patrón de expresión más extenso en el eje A-P, mientras los más lejanos están restringidos a la región posterior, al revés que como ocurría en la fase anterior. Precisamente por esta regulación tan compleja y porque un mismo gen puede expresarse en las regiones precursoras de varios segmentos P-D, los genes *Hoxd* pronto se descartaron como posibles marcadores P-D (Yokouchi *et al.*, 1991).

Los genes 5' *Hoxa*, en cambio, presentan patrones de expresión que sí podrían amoldarse a lo requerido. Estos genes presentan también cierta colinearidad temporal (*Hoxa9* y *10* se expresan antes que *Hoxa11* y *13*), así como espacial. Esta última característica se da sobre todo en el caso de *Hoxa11* y *Hoxa13*, que en estadios avanzados están restringidos a zeugopodio y autopodio, respectivamente (Yokouchi *et al.*, 1991; Haack y Gruss, 1993; Nelson *et al.*, 1996; Mercader *et al.*, 2009). Esto obviamente los convierte en candidatos para marcadores moleculares de estos dos segmentos.

En el caso del estilopodio, no hay ningún gen *Hox* que se exprese con un patrón claramente restringido a este segmento tanto en extremidad superior como anterior. Sin embargo, sí que hay otros genes *Homeobox* que muestran este patrón. Se trata de *Meis1* y *Meis2*, pertenecientes a la familia TALE (*three aminoacid loop extension*) de factores homeodominio (Fig. 17a'). En estadios avanzados, cuando ya se pueden distinguir las condensaciones de los futuros elementos esqueléticos, estos genes se expresan exclusivamente en el estilopodio (Mercader *et al.*, 1999). A nivel molecular, una de las principales acciones de los factores MEIS consiste en provocar la importación nuclear de los factores PBX, otras proteínas homeodominio de la familia TALE. MEIS, PBX, HOX y otros factores actúan juntos, en diversas combinaciones, para activar sus dianas transcripcionales (revisado en (Mann y Affolter, 1998)). En el primordio de extremidad, se ha propuesto que el principal cofactor de MEIS sería PBX1 (Gonzalez-Crespo *et al.*, 1998; Capdevila *et al.*, 1999; Mercader *et al.*, 1999; Capellini *et al.*, 2006). Tanto MEIS1 como MEIS2 (muy similares a nivel de secuencia proteica) presentan varias isoformas, derivadas de fenómenos de *splicing* alternativo, que determinan, entre otras propiedades, su capacidad de unión con los factores HOX ((Moens y Selleri, 2006), Fig. 17a'). No obstante, si bien el dominio final de expresión de estos genes correlaciona muy bien con los tres segmentos P-D, lo cierto es que el patrón de estos genes es muy dinámico, sobre todo en el caso de *Meis1/2* y *Hoxa11*, que inicialmente cubren un dominio relativamente mayor que en estadios más avanzados (Fig. 17b). Por tanto, surgen dudas de si estos genes actúan de marcadores desde el principio de su expresión o no, lo cual resulta muy relevante a la hora de proponer modelos que expliquen la formación de patrón P-D (ver siguiente apartado).

Otra cuestión a considerar es el aspecto funcional. Ya se ha comentado que los putativos marcadores P-D pueden tener dos tipos de funciones: bien ser responsables del estado de especificación, o simplemente reflejarlo, a la par que median algunas de sus consecuencias a nivel celular. En el primer caso, la pérdida de función del marcador de un segmento en cuestión implicaría que dicho segmento no se especificaría, y que su expresión ectópica podría provocar una transformación de un segmento en otro. En el segundo caso, la falta de función no provocaría la ausencia del segmento, pero si la pérdida de algunas de sus características a nivel celular, lo que probablemente se reflejaría en distorsiones de la forma o tamaño del segmento en cuestión. A su vez, su sobreexpresión ectópica no provocaría la generación de un segmento concreto en lugar de otro, sino una alteración de las propiedades celulares básicas, afectando de nuevo a la forma o tamaño de los elementos. Por los motivos que se van a exponer, los genes descritos hasta el momento parecen pertenecer al segundo caso.

El mutante de falta de función de *Hoxa11* presenta unos defectos menores en el zeugopodio, algo más notables en la extremidad inferior (Davis *et al.*, 1995; Zhao y Potter, 2001) (Fig. 17c). Algo similar ocurre con *Hoxd11*, que además tiene reducidas algunas falanges (Davis y Capecchi, 1994). Sin embargo, la pérdida combinada de ambos provoca graves defectos en el zeugopodio de la extremidad superior, casi ausente (Fig. 17c). Para que un defecto similar afecte la extremidad inferior, debe eliminarse también *Hoxc11*, que no se expresa en la superior (Wellik y Capecchi, 2003). No obstante, la condensación inicial se forma normalmente,

## I. INTRODUCCIÓN

---

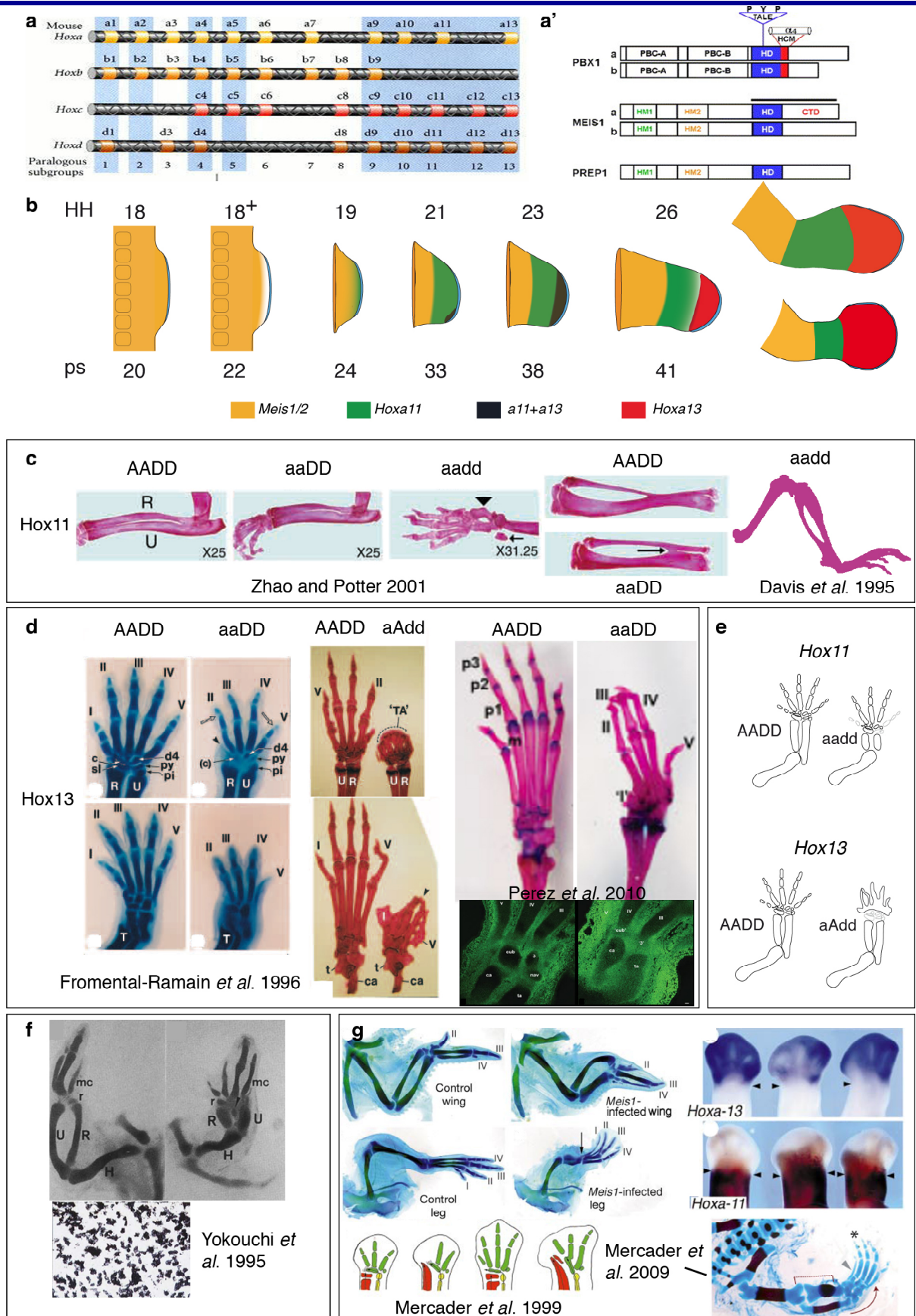
y el defecto radica principalmente en el crecimiento y diferenciación del elemento esquelético (Boulet y Capecchi, 2004) (Fig. I7e).

Otros genes relacionados con el segmento intermedio son los genes *Shox* (*short stature homeobox*). Mutaciones en el gen *SHOX* están asociadas a un acortamiento de los huesos del zeugopodio en diversos síndromes humanos (ver referencias en (Tiecke *et al.*, 2006)), aunque su sobreexpresión en pollo no provoca defectos en la formación de patrón, pero sí un incremento de la longitud de algunos huesos, sugiriendo que su efecto es más bien tardío y restringido a algunos tejidos. Curiosamente, en ratón sólo hay ortólogo de *SHOX2*, no de *SHOX*, y la falta de función de *Shox2* provoca la casi ausencia de estilopodio, debida a que la condensación inicial, aunque se forma bien, no crece ni se diferencia adecuadamente (Yu *et al.*, 2007).

En cuanto a *Hoxa13*, su falta de función provoca algunos defectos en el autopodio, como la pérdida del dedo 1, reducción en general de las falanges y de los metacarpos/ metatarsos, y en los pocos casos en que llegan a adultos, se aprecian malformaciones e indefinición en los huesos del tobillo (Fromental-Ramain *et al.*, 1996b; Perez *et al.*, 2010). Como en el caso de *Hoxa11*, dichas malformaciones se acentúan de manera sinérgica al eliminar también *Hoxd13*, de modo que el autopodio del doble mutante cuenta casi exclusivamente con metacarpos/metatarsos, que además están muy reducidos y dismórficos (Fromental-Ramain *et al.*, 1996b) (Fig. I7d). De nuevo, aunque las condensaciones se forman inicialmente bien, su resolución en elementos concretos de forma adecuada acaba fracasando (Fromental-Ramain *et al.*, 1996b; Perez *et al.*, 2010) (Fig. I7e). Es destacable que parte del fenotipo de estos mutantes se ha relacionado con alteraciones en la expresión de receptores del tipo Eph (Stadler *et al.*, 2001; Salsi y Zappavigna, 2006), que, como se verá más adelante, están involucrados en los fenómenos de adhesión intercelular. Por otro lado, la sobreexpresión de *Hoxa13* en la extremidad de pollo también provoca cambios en las propiedades de adhesión de los precursores condrogénicos, de modo que en el zeugopodio tienden a formarse elementos esqueléticos más pequeños y redondeados, similares a los de la muñeca (Yokouchi *et al.*, 1995) (Fig. I7f).

La falta de función de los genes *Meis* no se ha podido analizar en su totalidad, porque aunque el mutante de *Meis1* no tiene fenotipo en la extremidad (Hisa *et al.*, 2004; Azcoitia *et al.*, 2005), todavía no se ha comprobado si esto es debido a una redundancia con *Meis2* (la heterocigosis para este gen es letal, impidiendo la obtención de individuos homocigotos). Por su parte, la ganancia de función en la extremidad, tanto en pollo como en ratón, más que dar lugar a la formación de un estilopodio ectópico o de tamaño desmesurado, lo que provoca es un desarrollo inadecuado o incluso truncamiento de las estructuras distales, afectando a la forma de sus elementos y a cómo se articulan entre sí, así como a las propiedades de adhesión intercelular (Capdevila *et al.*, 1999; Mercader *et al.*, 1999; Mercader *et al.*, 2000; Mercader *et al.*, 2009) (Fig. I7g). Estos efectos se acompañan de cambios en el patrón de expresión de *Hoxa11* y *Hoxa13*, que se ven desplazados hacia regiones más distales, sugiriendo que la extremidad sufre cierta “proximalización” a nivel molecular (Mercader *et al.*, 1999; Mercader *et al.*, 2009) (Fig. I7g).





## I. INTRODUCCIÓN

**Figura 17 (página anterior).** Expresión y funciones de los marcadores P-D. **a** y **a'**, Diagramas que representan los *clusters* Hox de vertebrados (**a**, modificado de Gilbert, *Developmental Biology*) y algunos genes TALE (**a'**, modificado de (Moens y Selleri, 2006)). **b**, Resumen de la dinámica de expresión de *Meis1/2*, *Hoxa11* y *Hoxa13*, en los colores indicados. Se indican el estadio de pollo (parte superior, HH) y el de ratón (inferior, pares de somitos). **c**, Fenotipo de las diversas combinaciones de mutantes del grupo parálogo 11. **d**, Lo mismo, con el grupo 13. **e**, Aspecto de las condensaciones de mutantes de los grupos 11 y 13 a día E13.5. En gris pálido aparecen las condensaciones peor formadas. **f**, Consecuencias de la sobreexpresión de *Hoxa13* en los elementos del zeugopodio (arriba derecha), y en las propiedades de adhesión en cultivo (abajo). Células de estadio HH20, infectadas para sobreexpresar *Hoxa13* y mezcladas con células silvestres, terminan separándose de las no infectadas, formando nódulos con otras células infectadas. **g**, fenotipos anatómicos y moleculares obtenidos tras la sobreexpresión de *Meis1* en ratón (abajo derecha) y en pollo (resto). Las imágenes se obtuvieron de las referencias indicadas.

Finalmente, se han descrito algunas combinaciones de mutantes en los que el estilopodio está muy afectado. Así, el triple mutante de *Hoxacd10*, tiene una extremidad superior bastante normal, pero la inferior carece de fémur (Wellik y Capecchi, 2003). Por su parte, el doble mutante de *Hoxad9* tiene el húmero bastante reducido, aunque la extremidad inferior no está afectada, quizá porque expresa *Hoxc9* (Fromental-Ramain *et al.*, 1996a).

En definitiva, una pregunta importante para la que todavía no se tiene respuesta es **cuál es la historia de expresión de marcadores P-D por la que pasan los precursores de los distintos segmentos de la extremidad**.

Otro aspecto interesante de *Hoxa13* es que no sólo se expresa durante el desarrollo, sino que también se ha descrito su expresión en la extremidad adulta. De hecho, los fibroblastos de todo el cuerpo humano adulto conservan una especie de código posicional en base a tres parámetros fundamentales: anterior vs posterior, proximal vs distal y dérmico vs no dérmico (Rinn *et al.*, 2006). En la extremidad, parece haber una distinción muy clara entre fibroblastos situados distales a la muñeca (que expresan *HOXA13*), y el resto (que no expresan *HOXA13* pero sí *HOXD4* y *HOXD8* en el caso de la pierna). Curiosamente, el codo no se identificó como un límite claro en base al perfil de expresión (Rinn *et al.*, 2006). En cuanto a *Hoxa11*, se ha mostrado que se expresa en los osteocitos de la tibia de ratón adulto, y les confiere una identidad que se mantiene incluso cuando se transplantan heterotópicamente (Leucht *et al.*, 2008). Curiosamente, *Hoxa13* también se expresa en los osteocitos de la tibia (Leucht *et al.*, 2008).

### I.2.5.4 Modelos de formación de patrón P-D.

A lo largo de los años, conforme se han ido acumulando o reinterpretando resultados experimentales, se han propuesto marcos teóricos para explicar cómo se adquiere la identidad a lo largo del eje P-D. Son los llamados modelos de formación de patrón, que se explican a continuación:

- Modelo de la zona de progreso.

El nombre zona de progreso (*progress zone*, PZ, en inglés) hace referencia a una región de mesénquima de unas 300 micras de espesor que yace inmediatamente bajo el AER y que está bajo la influencia de las señales procedentes de ésta (Summerbell *et al.*, 1973). Las células de esta región permanecen indiferenciadas mientras permanezcan bajo la influencia de dichas señales. Lo que propone este modelo es que dentro de la PZ las células van adquiriendo identidades progresivamente más distales, en virtud de una especie de reloj interno de destinos próximo-distales. Una vez que las células abandonan la región de la PZ debido al crecimiento próximo-distal de la extremidad, su identidad quedaría fijada, comenzando entonces su proceso de diferenciación. De este modo, las células que abandonen primero la PZ darán lugar

a los elementos más proximales, mientras que las que la abandonen más tarde darán lugar a elementos más distales (Fig. 18a). En un primer momento se propuso como mecanismo de cronómetro (para medir el tiempo que pasaban en la PZ) que las células contaban el número de divisiones que tenían lugar en dicha región, e incluso hubo intentos de equiparar el número probable de divisiones que ocurrían en la zona de progreso con el número de elementos que al final forman la extremidad (Lewis, 1975), pero en la actualidad este mecanismo está prácticamente descartado.

Hay tres hechos experimentales fundamentales en los que se basa este modelo:

- Los truncamientos provocados por la extirpación quirúrgica del AER son tanto más distales cuanto más tarde se elimina el AER (Saunders, 1948; Rowe y Fallon, 1982). La interpretación consistía en que dicha eliminación detiene el avance de las células de la PZ hacia identidades más distales, por lo que una vez que ocurre la diferenciación, el elemento más distal formado revela el estado en que se encontraban las células de la PZ.

- La irradiación con rayos X sobre un primordio provoca que éste sólo forme elementos distales (Wolpert *et al.*, 1979). La explicación que se propuso era que tras la muerte producida por la irradiación, a las células supervivientes les llevaría un tiempo expandirse para volver a rellenar la zona que queda bajo la influencia de las señales del AER, de modo que para cuando logran salir de la PZ, su reloj interno ya ha avanzado unos cuantos pasos, por lo que su identidad es más distal que la de aquellas que salieron de la PZ antes de la irradiación.

- Extremidades quiméricas formadas por un trasplante de PZ al muñón de un primordio de extremidad (al que se le ha quitado su propia zona de progreso) dan lugar a delecciones intersticiales en el caso de que la extremidad receptora sea de un estadio previo a la donante, o a una extremidad con duplicaciones en tándem para el caso de que la extremidad receptora sea de un estadio más avanzado (Summerbell y Lewis, 1975). Estos experimentos parecían descartar la participación de factores difusibles provenientes de la región proximal (primer caso) así como que los elementos ya especificados pudieran inhibir la formación de destinos iguales a los suyos (ver apartado 1.2.5.5 para una relación más detallada de este tipo de experimentos).

No obstante, una vez en la era molecular, hay hechos que éste modelo no puede explicar. Según la teoría, la PZ es uniforme en cuanto al estado de especificación de las células que la componen, ya que éste no depende de mecanismos no autónomos. Si *Meis1/2*, *Hoxa11* y *Hoxa13* se aceptan como marcadores que reflejan el estado de especificación, entonces su expresión debería cambiar simultáneamente en toda la zona de progreso. Esto no ocurre así, sino que es en la zona más inmediatamente bajo el AER donde ocurren los primeros cambios de expresión (con un sesgo posterior, además, en el caso de *Hoxa13*). Por otro lado, a pesar de los esfuerzos dedicados para buscarlo, no se ha encontrado un mecanismo molecular que pueda actuar de reloj intrínseco celular para todo el desarrollo P-D. Solamente hay un trabajo en el que se describe que un oscilador molecular (*Hairy2*) podría estar involucrado en la formación de patrón del autopodio (Pascoal *et al.*, 2007). Este tipo de mecanismo oscilatorio resulta ideal para la generación de estructuras métaméricas, como está claro que ocurre durante la segmentación del eje principal (Palmeirim *et al.*, 1997; McGrew *et al.*, 1998; Palmeirim *et al.*, 1998), pero durante el desarrollo P-D de la extremidad, las únicas estructuras métaméricas son las falanges, por lo que sigue faltando un reloj molecular que explique la formación de patrón en el resto del eje. Además, se cree que *Hairy2* está encargado de la transducción de la señalización de Notch, y la alteración de esta vía no produce un fenotipo de segmentación en la extremidad (Pan *et al.*, 2005).



## I. INTRODUCCIÓN

---

- Modelo de especificación temprana.

En trabajos recientes (Dudley *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2002), se propuso que la especificación de destinos en el eje P-D no ocurre de manera progresiva, sino que dichos destinos (los de estilopodio, zeugopodio y autopodio) ya están previamente especificados desde un estadio muy temprano. De este modo, lo único que ocurre en una secuencia de proximal a distal es la expansión y diferenciación de cada uno de esos elementos. En consecuencia, las células de elementos más proximales se encuentran siempre en un estadio más avanzado de expansión y diferenciación que las de elementos más distales. La interpretación más fuerte de este modelo establecería que los distintos elementos P-D se comportan como compartimentos, es decir, que las células que pertenecen a esos dominios distintos no se mezclan entre sí, de modo que la identidad P-D se hereda estrictamente por linaje (Fig. I8b).

Los resultados experimentales (o reinterpretación de resultados anteriores) en los que se basa este modelo son los siguientes:

- Trazado de linaje con colorantes lipofílicos. Las células marcadas en una posición concreta del primordio temprano de la extremidad contribuyen finalmente a sólo uno de los elementos P-D. El marcaje a menos de 100 micras desde el AER en un primordio de ala de pollo de estadio 19 da lugar a células marcadas sólo en autopodio. Entre 100 y 200 micras se marca zeugopodio, y entre 200 y 300 micras se marca estilopodio (Dudley *et al.*, 2002). Merece la pena destacar que un trabajo más reciente de trazado de linaje mediante este método, realizado de manera sistemática, parece revelar que existe una zona de espesor 150-200 micras desde el AER en la que no hay separación de destinos, sino una gran mezcla de ellos (Sato *et al.*, 2007). La separación de destinos ocurriría de manera progresiva de proximal a distal, de modo que los destinos que permanecen mezclados en esa región (que podría ser una redefinición de la zona de progreso) van siendo progresivamente más distales conforme avanza el desarrollo. Así, en HH19, la separación se sitúa entre estilopodio y el resto de elementos, de modo que los destinos de zeugopodio y autopodio están bastante mezclados. En cambio, en HH23 ya hay separación entre destino de zeugopodio y autopodio, pero no lo hay entre metacarpos y falanges. Los autores de este trabajo interpretan que en el trabajo de Dudley y colaboradores sólo se hicieron marcajes en puntos muy concretos, pero no a lo largo de todo el eje P-D y por eso no observaron la mezcla de destinos. ***Una cuestión interesante que queda no obstante sin resolver es si esa regionalización progresiva se puede observar a cualquier nivel P-D (estudiando los estadios adecuados) o sólo a nivel de las articulaciones***, que es en lo que hacen énfasis Sato y colaboradores.

- Tras la eliminación del AER se observa muerte celular (en estadios tempranos), y/o disminución de proliferación (en estadios avanzados) en una franja de mesénquima de unas 200 micras de espesor (Dudley *et al.*, 2002). Dichos efectos podrían explicar los fenotipos de truncamientos progresivamente más distales sin necesidad de recurrir al modelo de zona de progreso. Como los elementos proximales se expanden y diferencian antes que el resto, deja de afectarles la eliminación del AER antes que a los demás elementos.

- Transplante de zonas de progreso de 100 micras de grosor (en uno de los experimentos fundacionales del modelo de la zona de progreso se hacían unos transplantes de este grosor y otros de 300 micras) a un muñón más proximal. La zona transplantada dio lugar únicamente a autopodio (Dudley *et al.*, 2002).

- Recombinantes de mesénquima distal. Consisten en coger 75-100 micras de mesénquima antero-distal de la extremidad de un estadio concreto para reconstituir una extremidad artificial, recubrirla de ectodermo del tamaño adecuado, y transplantarla al flanco de un embrión.

Cuando el mesénquima procede de donantes de estadios HH19 – 20, se forma la secuencia próximo-distal completa; cuando procede de HH22, se formaba zeugopodio y autopodio (y quizá la parte más distal de estilopodio); sólo cuando se cogían donantes de estadios más avanzados (como HH24), el recombinante daba lugar exclusivamente a dedos. Estos resultados en realidad no encajan con ninguno de los dos modelos vistos hasta el momento. Según el modelo de la zona de progreso, en estadio 19 se está especificando el destino de zeugopodio proximal, y según el modelo de especificación temprana, las 100 micras más distales de un primordio temprano de extremidad deberían dar lugar sólo a autopodio. Sin embargo el recombinante daba lugar a los tres elementos P-D. La interpretación que se dio desde el punto de vista del modelo de especificación temprana era que aunque el destino estaba especificado previamente, en los estadios tempranos dicho destino no estaba determinado, sino que era susceptible de reprogramación. En los estadios avanzados ya no existía esta posibilidad de reasignación.

- Cuando se elimina la función de *Fgf8* sólo o en combinación con *Fgf4* en el AER, el análisis de los fenotipos en la extremidad superior e inferior conduce a la conclusión de que, entre otros, un importante papel de los FGFs es reclutar un número suficiente de progenitores condrogénicos para los distintos elementos de la extremidad, y luego expandirlos. Dada la dinámica de la expresión de los distintos *Fgfs* y de los fenotipos observados, se concluyó que los precursores de los 3 segmentos se establecen tempranamente, y que luego se expanden en una secuencia de proximal a distal (Sun *et al.*, 2002).

- El doble KO de *Gli3* y *Plzf* presenta defectos que afectan especialmente a la formación de estilopodio y zeugopodio en la extremidad inferior, sin que la expresión de los marcadores típicos esté alterada (Barna *et al.*, 2005). Esto se interpretó como prueba de la existencia de un programa genético exclusivo de la zona proximal, independiente de otro posible programa para la zona distal. Dada la expresión temprana de ambos genes, se propuso que desde muy temprano, la extremidad ya está dividida en dominios proximal y distal. Lo que sería discutible es si los defectos observados son debidos a un problema de especificación o de diferenciación, aspecto que no se ha abordado todavía.

- Consistentemente con la propuesta anterior, los mismos autores encontraron que las células proximales y distales de la extremidad de pollo de HH19, cuando se cultivan en unas condiciones determinadas, pueden distinguirse unas de otras en base a sus propiedades de adhesión (los llamados ensayos de *sorting out*) (Barna y Niswander, 2007). Esta diferencia temprana en propiedades celulares se interpretó de nuevo en la línea del modelo de especificación temprana. Cabe la duda, no obstante, de si HH19, cuando ya hay expresión de *Hoxa11* en la parte distal, y los genes *Meis* se han restringido a proximal, es un estadio tan temprano como se pretende. El hecho de que molecularmente haya un dominio proximal y otro “no proximal” sugiere más bien lo contrario (ver Discusión).

Además de las matizaciones que se han ido haciendo en cada punto anterior, hay un experimento que claramente permite descartar este modelo, al menos en su formulación más fuerte. Se trata de un experimento de análisis clonal en el que, en distintos momentos del desarrollo, se marca una sola célula de la extremidad (Arques *et al.*, 2007). Al estudiar los clones formados en el eje P-D, se observó que no existía restricción en la posición de los clones a lo largo del eje, es decir, se encontraron clones que recorrían dos o más elementos P-D, descartando que éstos se comportaran como compartimentos. Además, el mismo grupo que había propuesto el modelo de especificación temprana realizó un análisis parecido en el embrión de pollo, llegando a conclusiones similares (Pearse *et al.*, 2007). Los resultados son

## I. INTRODUCCIÓN

compatibles con el modelo de PZ pero no pueden confirmarlo, y quizá no sea descartable que formulaciones “más suaves” del modelo de especificación temprana puedan ser compatibles con lo observado. También es destacable que se desconocen marcadores moleculares que desde muy temprano se expresen en los supuestos precursores de los tres segmentos.

- Modelo de dos señales.

Según este modelo, la formación de patrón P-D en la extremidad no es un proceso autónomo, sino que está gobernado por señales difusibles. Una de éstas señales es RA, que confiere características proximales, y la otra son los FGFs, que confieren características distales (Mercader *et al.*, 2000). El efecto de ambas señales es por tanto opuesto, y la proximidad o lejanía a cada una de estas señales es lo que determina la especificación hacia un destino u otro. Una característica fundamental de este modelo es que acopla de manera elegante el crecimiento P-D de la extremidad con la formación de patrón. Así, inicialmente, las células de la extremidad están expuestas a ambas señales (RA producido en el flanco y FGFs producidos en el AER), y el modelo postula que en esa situación el efecto de RA se impone, confirmando a la extremidad carácter proximal. Sin embargo, conforme la extremidad va creciendo, la zona distal se va alejando de la fuente de RA, por lo que el efecto distalizante de FGF supera al proximalizante de RA, y se produce el cambio de identidad de estilopodio a “no estilopodio” (Fig. I8c). El modelo no precisaba cómo se producía la asignación de identidad zeugopodio vs autopodio. Sin embargo, resultaba tentador pensar que, al seguir creciendo la extremidad, las células más distales se liberaban totalmente de la influencia de RA, de forma que FGF las instruía para formar el autopodio.

Los resultados que apoyan este modelo son los siguientes:

-Trabajos “clásicos” de regeneración de la extremidad en ajolote y otros anfibios habían encontrado que RA tiene la capacidad de reprogramar las células del blastema (la estructura indiferenciada que da lugar a los elementos que se reemplazan) hacia destinos más proximales que los que les corresponden, provocando duplicaciones en tándem (Saxena y Niazi, 1977; Maden, 1983a, 1983b, 1983c). En un intento de reproducir en el embrión de pollo esos resultados, Mercader y colaboradores llegaron a una conclusión similar (Mercader *et al.*, 2000). No obstante, en este caso no se formaron duplicaciones en tándem, sino que las células expuestas a RA cambiaban sus propiedades de adhesión hacia otras más proximales (algo ya descrito en (Tamura *et al.*, 1997)), de modo que se incorporaban al elemento del estilopodio.

- Además, el tratamiento con RA provocaba cambios en la expresión de marcadores como *Hoxa11* y *Hoxa13* (que se desplazaban hacia regiones más distales), similares a los que provoca la sobreexpresión de *Meis1* (Mercader *et al.*, 1999; Mercader *et al.*, 2000). De hecho, *Meis1/2* se identificaron como dianas de RA, al menos cuando se administraba exógenamente (Mercader *et al.*, 2000).

-Además de RA, que se produce en el flanco del embrión y por tanto difunde desde la región proximal de la extremidad, formando un gradiente (Swindell *et al.*, 1999; Yashiro *et al.*, 2004), se identificó otra señal relevante para el patrón P-D, los FGFs. Estas moléculas, producidas en el AER, tenían un efecto contrario al de RA, es decir, promover destinos distales en la extremidad (la eliminación del AER, por ejemplo, provocaba una expansión distal de la expresión de los genes *Meis*, mientras que la implantación de una microesfera impregnada en FGF8 provocaba su inhibición en la región normal de expresión. FGF parecía afectar tanto a la señalización de RA como a su síntesis (Mercader *et al.*, 2000). Otras moléculas cuya aplicación es capaz de inhibir la expresión de los genes *Meis* son las BMPs (Capdevila *et al.*, 1999;

Mercader *et al.*, 2000). La expresión endógena de estas moléculas ocurre en el mesénquima distal y en el AER, y podrían colaborar con los FGFs en la restricción proximal de *Meis*.

En cuanto a los problemas del modelo, quizá el principal sea que la mayor parte de los experimentos que condujeron a él implicaban el uso de moléculas aplicadas de manera exógena, en muchas ocasiones en concentraciones superiores a la fisiológica. De hecho, como se verá después, el papel de RA endógeno en la formación de patrón P-D es motivo de controversia actualmente (Yashiro *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2009; Pennimpede *et al.*, 2010).

Recientemente se ha propuesto una versión modificada de este modelo, en la que los segmentos proximal y distal se especifican tempranamente en virtud del efecto de las dos señales, mientras que el segmento intermedio surge más tarde, como consecuencia de la interacción e intercalación entre los segmentos previamente formados (Mariani *et al.*, 2008). Esta variante se basa sobre todo en el hecho de que una combinación particular de mutantes de *Fgfs* (ver apartado sobre FGFs) forma sólo estilopodio y autopodio, pero no zeugopodio (Mariani *et al.*, 2008). En realidad, en el estudio no se abordaba si se trataba de un problema de especificación o de diferenciación, pero sí es cierto que la condensación del zeugopodio no estaba presente cuando se comprobaba la expresión de *Sox9*, marcador de los primeros estadios de condrogénesis (Mariani *et al.*, 2008). Este fenotipo resulta complicado de explicar por la versión original del modelo (Mercader *et al.*, 2000), que más probablemente predeciría la pérdida del autopodio. Otro aspecto a favor de la nueva versión del modelo es que se comprueba genéticamente que niveles endógenos de FGF, no añadidos artificialmente, tienen un importante papel instructivo.

Pese a todo, esta variante del modelo no puede explicar con facilidad los resultados del análisis clonal realizado por Arques y colaboradores (Arques *et al.*, 2007). Si el segmento intermedio proviene de alguno de los otros dos segmentos (Mariani y colaboradores postulaban que del distal), el linaje descendiente de una sola célula marcada podría marcar como mucho dos elementos (estilopodio-zeugopodio o zeugopodio-autopodio). Sin embargo, pueden encontrarse clones que marquen los tres segmentos (Arques *et al.*, 2007), algo difícilmente explicable por un mecanismo que no sea progresivo.

- Modelo de frente de diferenciación.

En vista de que los modelos de zona de progreso y especificación temprana no podían explicar algunos de los resultados que se han comentado, Wolpert y Tabin (los proponentes de uno y otro modelo) revisaron la cuestión a nivel teórico, proponiendo un nuevo marco conceptual: el modelo del frente de diferenciación (Tabin y Wolpert, 2007). Sin hacer demasiado hincapié en el modo de especificación, pero admitiendo como opción más probable la participación de señales, la clave del modelo radica en proponer que las células interpretan su información posicional cuando salen de la zona de influencia del AER. Mientras están bajo esa influencia, las células se mantienen indiferenciadas, en un estado de especificación lábil. Sin embargo, debido al crecimiento, llega un momento en que abandonan dicha zona y es entonces cuando adquieren su identidad y empiezan el programa de diferenciación. El tiempo que hayan permanecido indiferenciadas expresando un gen concreto influirá en el tamaño del precursor de un elemento antes de comenzar la diferenciación, y por tanto el tamaño del elemento final. Al igual que en el modelo de Sun y colaboradores (Sun *et al.*, 2002), en este modelo se postula que para que un elemento esquelético se forme, su precursor debe alcanzar un tamaño mínimo antes de iniciarse la diferenciación. El modelo predice que cualquier circunstancia que reduzca mucho el número de células que forman el precursor de un elemento cuando éste va a entrar en diferenciación, tendrá como consecuencia la pérdida de dicho elemento (Fig. 18d).

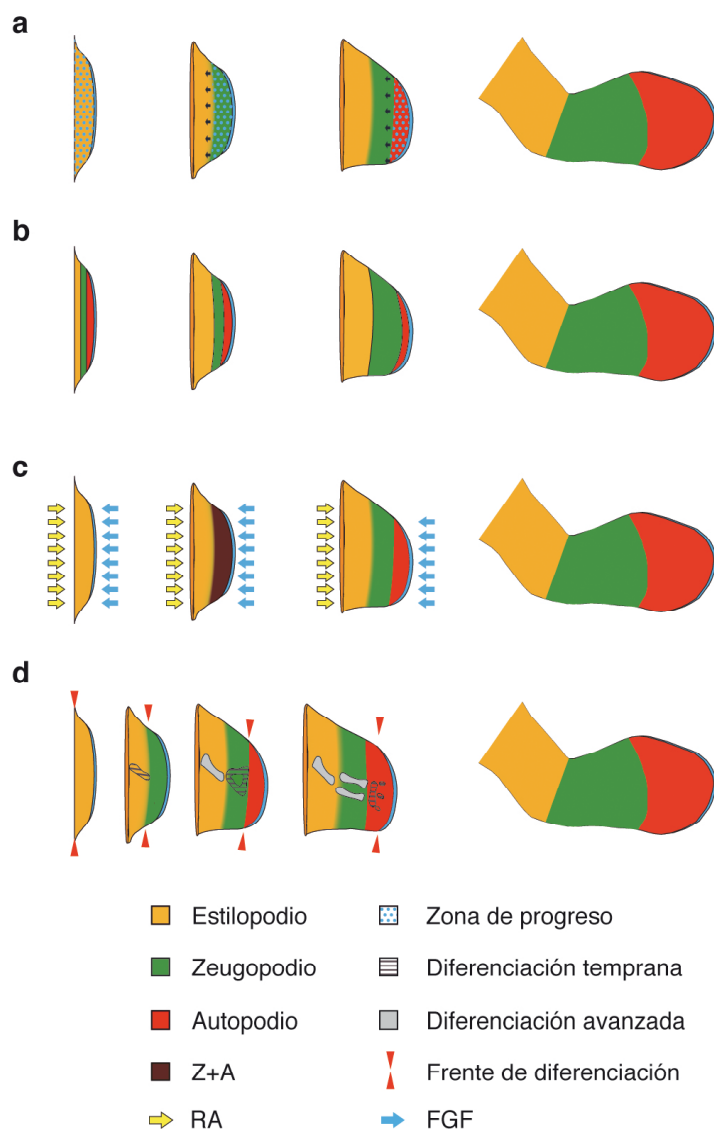
## I. INTRODUCCIÓN

Éste es quizá el modelo más aceptado en la actualidad, en su variante que incorpora el sistema de información posicional del modelo de dos señales (Benazet y Zeller, 2009; Zeller *et al.*, 2009). Después de su proposición, se han realizado (o revisitado) experimentos que podrían apoyarlo:

- La irradiación de primordios de extremidad, realizada por Wolpert y colaboradores inicialmente, fue repetida por Galloway, Delgado y colaboradores, pero esta vez usando trazado de linaje y marcadores moleculares (Galloway *et al.*, 2009). Mediante estas técnicas llegaron a la conclusión de que la ausencia de un elemento concreto tras la irradiación no se debía a que sus precursores se incorporasen a un segmento distinto del que normalmente formaban, sino a que el tamaño del elemento precursor quedaba demasiado afectado justo en el momento de mayor sensibilidad: antes de iniciar su diferenciación. Consistentemente con esto y con el proceso de diferenciación progresivo, la irradiación en estadios tempranos provocaba la pérdida del estilopodio, la irradiación más tardía afectaba al zeugopodio, y la irradiación aún más tardía afectaba al autopodio.

A pesar del carácter integrador del modelo, sigue habiendo fenotipos que no puede explicar de manera sencilla, como los mutantes de Fgfs que carecen de zeugopodio.

En resumen, pese a todos los avances realizados desde 1973 (sobre todo a nivel molecular), **sigue faltando un modelo que integre y explique todos los resultados experimentales.**



**Figura 18.** Modelos de especificación de destinos en el eje P-D. El esquema representa primordios de extremidad cada vez más tardíos, con el eje P-D orientado de izquierda a derecha. El código de colores indica el estado de especificación y/o diferenciación. **a**, Modelo de zona de progreso. Zona sombreada= región de mesénquima indiferenciado bajo la influencia del AER. La especificación y posterior diferenciación de los distintos elementos ocurre de proximal a distal. **b**, Modelo de especificación temprana. Desde un momento muy temprano en el desarrollo del primordio, ya están especificados los distintos elementos P-D. Lo que ocurre en secuencia proximal a distal es su expansión y diferenciación. **c**, Modelo de dos señales. RA (flechas amarillas) y FGF (azules) tienen efectos opuestos sobre la especificación. El crecimiento del primordio provoca que las células que se están especificando se alejen progresivamente de la señal proximal, quedando siempre a la misma distancia de la distal. Esta dinámica da lugar a que los destinos se especifiquen de manera progresiva, de proximal a distal. **d**, Modelo de frente de diferenciación. Las puntas de flecha roja marcan el frente de diferenciación, a una distancia aproximadamente constante del AER. Recién salidos de la zona indiferenciada, los precursores de los elementos son especialmente sensibles a situaciones que reduzcan el número de células, como la irradiación. Pasado un tiempo, el proceso de diferenciación está más avanzado, y el elemento es más robusto.



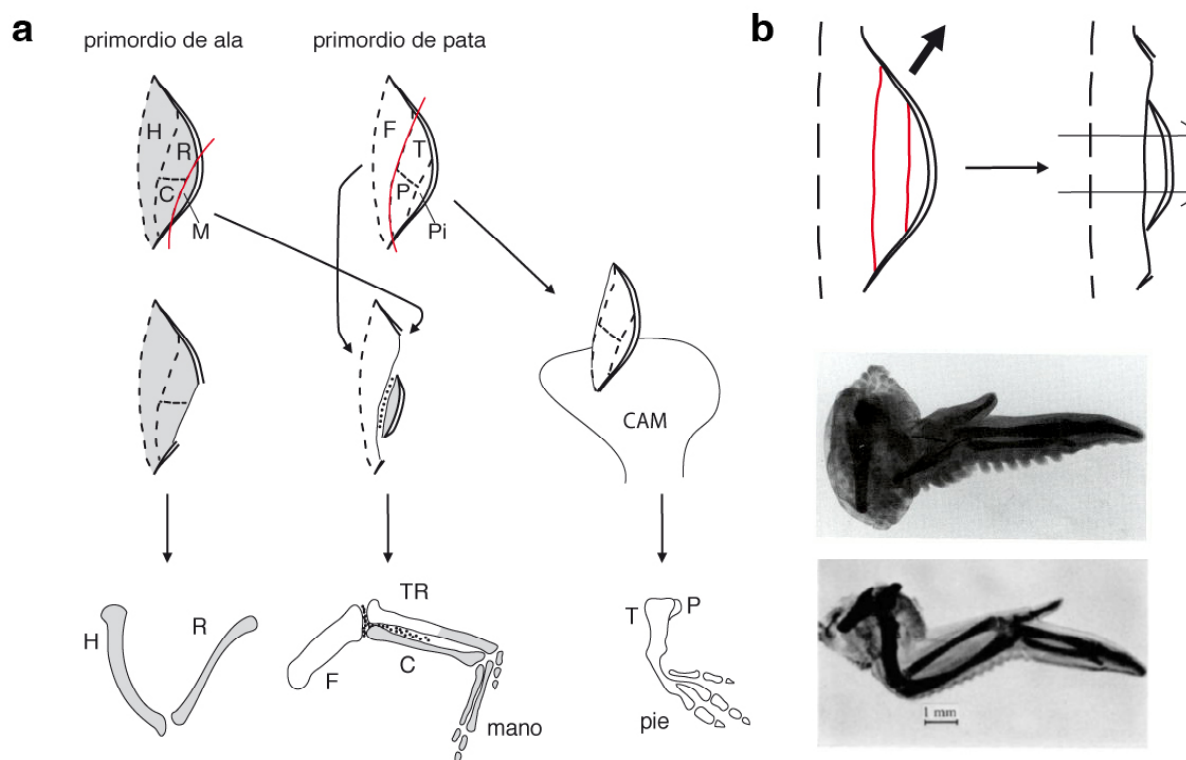
## I.2.5.5 Regulación frente a mosaicismo.

Una pregunta importante en biología del desarrollo es si el embrión se desarrolla de modo mosaico (Roux, 1888), o regulativo (Driesch, 1892). Si, tras una manipulación, cada parte de un embrión da lugar sólo a aquellas regiones que habría producido en la situación normal, el patrón es mosaico. Por el contrario, si una fracción anormal de células en un embrión (o una parte de él) es capaz de dar lugar a un embrión (o una parte de él) normal, el patrón es regulativo (parafraseado de (Driesch, 1892)). Aunque finalmente ha quedado claro que el desarrollo real representa una situación intermedia entre el mosaicismo estricto y la regulación perfecta (ver resumen histórico en (Lawrence y Levine, 2006)), todavía es difícil establecer cuáles son las capacidades reguladoras de un sistema particular, y algunos acalorados debates permanecen sin resolver.

El primordio de extremidad se presta mucho a este tipo de estudios, que llevan realizándose más de 60 años. La cuestión es particularmente relevante para decantarse por uno u otro modelo de formación de patrón P-D (ver apartado anterior). Los primeros trabajos en hablar de desarrollo regulativo de la extremidad provenían de la “escuela francesa”. Se realizaron dos tipos de experimentos: regulación de duplicaciones en tándem (Kieny, 1964c; Amprino y Camosso, 1965), y regulación de deficiencias intersticiales a lo largo del eje P-D. En el contexto de esta tesis resulta más interesante el segundo tipo. En una serie de experimentos diseñados para demostrar que la capacidad instructiva P-D residía en el mesénquima, varios investigadores mostraron que cuando se eliminaba un fragmento intermedio de un primordio temprano, las partes restantes daban lugar a un eje P-D casi completo con bastante frecuencia (Wolff y Hampe, 1954; Hampe, 1959; Kieny, 1964a, 1964b; Pautou y Kieny, 1977) (Fig. I9a). Independientemente, utilizando experimentos similares, Amprino y Camosso también observaron algo de regulación, aunque la describieron como “imperfecta” (Amprino y Camosso, 1958, 1959a, 1959b).

La otra cara de la moneda está representada por la “escuela inglesa”. Summerbell, Lewis y Wolpert realizaron intercambios de puntas distales entre primordios de extremidad de distintos estadios, lo que daba lugar, según los mapas de destino disponibles, tanto a primordios deficientes (con deleciones intersticiales) como a otros con tejido en exceso (duplicaciones en tándem). En este caso no se produjo nada de regulación (Summerbell *et al.*, 1973; Summerbell y Lewis, 1975), es decir, las extremidades quiméricas se desarrollaron de acuerdo al destino de las partes transplantadas, aportando una nueva evidencia para su modelo de zona de progreso. No obstante, cuando Summerbell hizo un análisis mucho más extenso de estadios y cantidad de tejido cortado, encontró una considerable regulación cualitativa y cuantitativa al usar primordios de estadios tempranos, en los que no había empezado el proceso de diferenciación (Summerbell, 1977a, 1981) (Fig. I9b).

Otro experimento que se ha usado para evaluar la capacidad reguladora de la extremidad consiste en transplantar la punta distal de un primordio a distintas localizaciones del embrión (flanco, somitos, otro primordio de extremidad), y comprobar si el resultado se ve influido por el entorno del injerto. Al parecer, el resultado de un mismo experimento variaba significativamente dependiendo del tamaño o la localización exacta del injerto. Cuando lascas muy finas de tejido se injertaban en el flanco del embrión, daban lugar a un eje P-D completo, en lugar de sólo parte del autopodio (Zwilling, 1956). Sin embargo, cuando se empleaban injertos más gruesos, esa regulación P-D no se producía, sin importar el sitio de injerto: los somitos, el flanco o la región proximal del ala (Amprino y Camosso, 1959a, 1959b). Así pues, parece que el grosor del trasplante es relevante para este tipo de experimentos, **característica no entendida que resulta muy interesante y digna de un estudio a fondo.**



**Figura 19.** Regulación frente a autonomía. Experimentos de deficiencias intersticiales. **a**, Reproducción esquemática de uno de los experimentos en (Kieny, 1964b). H, R, C, M, F, T, P, Pi, TR, CAM = húmero, radio, cúbito, mano, fémur, tibia, peroné, pie, “tibia-radio” y membrana corioalantoidea. La línea roja representa el plano de corte. Nótese que en la extremidad quimérica (centro), faltan los precursores de zeugopodio, y sin embargo esta estructura se acaba generando. Las partículas de carbón (en negro) en la interfase sirven para trazar aproximadamente el origen del tejido. A izquierda y derecha aparecen los controles de que el corte se realizó donde se pretendía. **b**, Experimento de Summerbell (Summerbell, 1977a). Al eliminarse un fragmento intermedio del primordio, a veces se forma una extremidad con evidentes deficiencias (foto superior), pero otras se forma una extremidad cualitativamente normal (foto inferior), aunque de menor tamaño que el control. El estadio y el tamaño y posición de la región eliminada pueden resultar muy influyentes.

En cuanto a los posibles mecanismos que podrían conducir a la regulación observada en algunos casos, hay dos posibilidades obvias: algunas de las células distales son “reprogramadas” por el mesénquima proximal hacia destinos más proximales, y/o algunas de las células proximales adquieren destinos más distales debido a la influencia del injerto distal. Los primeros intentos de distinguir entre ambas posibilidades se llevaron a cabo mediante la colocación de partículas de carbón en la interfase receptor/injerto, y comprobando la posición final de dichas partículas. Usando este método, Kieny y colaboradores aseguraron que la mayor parte del elemento intermedio provenía de tejido del injerto, lo que sugería la proximalización de la punta distal transplantada (Kieny, 1964a, 1964b). Sin embargo, este sistema ha sido tachado de poco fiable (Lewis, 1975), lo que plantea dudas sobre la validez de los resultados mencionados. Otra aproximación consiste en hacer transplantes ala-pata o pata-ala, y basarse en la morfología del elemento formado para inferir su origen. Sin embargo, hay indicios de que, en ocasiones, el tejido de ala se puede incorporar en elementos con morfología de pata (Kieny, 1964b; Krabbenhoft y Fallon, 1989), y viceversa (Saunders *et al.*, 1955; Krabbenhoft y Fallon, 1989), lo que de nuevo convierte a este método en dudoso. Para solventar definitivamente el problema, Kieny y colaboradores usaron combinaciones pollo/codorniz, lo que permitía la determinación histológica del origen del tejido (Pautou y Kieny, 1977). En este caso, el elemento intermedio presentaba contribución tanto del tejido

proximal (sobre todo en la región preaxial) como del tejido distal (sobre todo en la región postaxial). Extrañamente, la regulación sólo fue observada cuando se transplantaba futuro autopodio de pollo sobre futuro estilopodio de codorniz, pero no al revés. Esto sugería la posibilidad de que diferencias en la tasa de crecimiento u otros parámetros entre las dos especies podían estar afectando los resultados, lo que limitaba su relevancia. En cualquier caso, de ser cierta la proximalización observada, una de las señales candidatas obvias sería RA, por los efectos que se han descrito en el apartado anterior. Por otro lado, los candidatos evidentes a provocar distalización serían las señales del AER. Además de los datos que ya se han comentado, existen muchos otros ejemplos en la literatura del reclutamiento de células hacia destinos más distales debido a la influencia del AER (Saunders *et al.*, 1955); así como de la generación de primordios ectópicos de extremidad cuando se aplican FGFs al flanco inter-primordios (Cohn *et al.*, 1995), o incluso regeneración del eje P-D completo cuando, tras una amputación distal, el muñón proximal es cubierto con un AER (Zwilling, 1956; Hampe, 1959), o tratado con microesferas impregnadas con FGFs (Taylor *et al.*, 1994; Kostakopoulou *et al.*, 1996; Kostakopoulou *et al.*, 1997). Sin embargo, este reclutamiento celular debido a señales del AER no parece afectar a los somitos (Amprino y Camosso, 1958, 1959a, 1959b). Finalmente, tanto experimentos clásicos como recientes han mostrado que pequeños grupos de células de primordios muy tempranos de extremidad pueden cambiar su contribución anatómica y su identidad molecular P-D cuando se transplantan heterotópicamente de regiones proximales a distales o viceversa (Krabbenhoft y Fallon, 1989; Wyngaarden y Hopyan, 2008). También se mostró que el tejido proximal pierde esta capacidad antes que el distal (Wyngaarden y Hopyan, 2008), sugiriendo que sólo el tejido indiferenciado es capaz de dicha reprogramación.

En definitiva, pese a los significativos avances de las últimas décadas, dos importantes problemas han impedido llegar a una conclusión definitiva en este tema:

1) Los resultados se interpretaban como prueba de regulación o mosaicismo basándose en los mapas de destino disponibles para deducir qué regiones prospectivas se estaban eliminando o transplantando. Cualquier inexactitud o interpretación errónea de estos mapas de destino pudo conducir a una interpretación incorrecta de los resultados. Para eliminar este problema, Summerbell usó una aproximación estrictamente cuantitativa, calculando una función matemática que correlacionaba la extensión P-D del primordio operado con la longitud final del ala resultante (Summerbell, 1977a). Cualquier desviación de la línea de regresión esperada para un desarrollo perfectamente mosaico se interpretó como regulación parcial. A pesar de su originalidad, el abordaje presentaba un sesgo importante: asumía una expansión uniforme a lo largo del eje P-D. Ahora se sabe que ese no es el caso, al menos para la extremidad de ratón (Boehm *et al.*, 2010), si bien las evidencias en pollo son contradictorias (Hornbruch y Wolpert, 1970; Fernandez-Teran *et al.*, 2006).

2) Por lo general, las medidas empleadas para identificar qué elementos se forman a partir del injerto y cuáles a partir del receptor han sido poco concluyentes. La única excepción consiste en los casos en los que se emplearon marcadores moleculares específicos de pata o ala en combinaciones de trasplantes ala/pata (Dudley *et al.*, 2002). Desafortunadamente, el fenómeno de regulación no fue estudiado en profundidad en este último caso.

***Así pues, encontrar un método para solventar ambos problemas se vuelve imperativo si se quiere avanzar en el campo del desarrollo regulativo de la extremidad.***



### I.2.5.6 Señales Próximo-Distales.

- FGFs.

La familia de los factores de crecimiento fibroblástico se compone en mamíferos de 22 genes que codifican proteínas relacionadas estructuralmente (la mayoría secretables). En vertebrados, los FGFs, con una masa molecular de 17 a 34 KDa, están altamente conservados en la secuencia aminoacídica central, pero no en los extremos N- y C- terminal (revisado en (Martin, 1998; Wilkie *et al.*, 2002; Itoh y Ornitz, 2004; Chen y Deng, 2005)). Se descubrieron en los años 70 como mitógenos presentes en cerebro y pituitaria. Ésta y sus demás funciones son ejercidas a través de la unión con receptores de FGF (FGFRs), del tipo tirosina kinasa. En vertebrados hay 4 genes distintos para FGFR, aunque FGFR1-3 sufren *splicing* alternativo, lo que da lugar a varias isoformas (b y c) con distintas afinidades de unión por diferentes grupos de FGFs. En general, FGFR2b se expresa en epitelios y responde a FGFs procedentes de mesénquima, mientras que FGFR2c se expresa en mesénquima y a FGFs procedentes de epitelios (aunque en la extremidad es diferente, ver más abajo). Para la unión entre FGF y receptor, resulta fundamental la participación de una tercera molécula: heparina o heparán sulfato proteoglicano (HSPG, a veces llamado FGFR de baja afinidad), que además estabiliza química y térmicamente los FGFs, y evita que difunda a distancias demasiado largas (Basilico y Moscatelli, 1992).

En el primordio de extremidad se expresan *Fgf4*, 8, 9 y 17 en el AER (4, 9 y 17 restringidos a la región posterior), así como *Fgf10* en el mesénquima distal (además, sólo en pollo, se expresa *Fgf2* en AER y ectodermo dorsal y en mesénquima distal y dorsal (Fallon *et al.*, 1994; Savage y Fallon, 1995)). En cuanto a la transducción de señal, FGFR2b se expresa en todo el ectodermo y a bajos niveles en el mesénquima, y un FGF10 proveniente del mesénquima subapical (Xu *et al.*, 1998), mientras que FGFR1c (y quizá en menor medida FGFR2c) se expresa en el mesénquima y a los FGFs provenientes del AER (Orr-Urtreger *et al.*, 1991; Ornitz *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2006). La unión a FGFs induce la formación de homodímeros o heterodímeros de los FGFRs, lo que resulta en su transfosforilación. Esto da lugar a la activación de dos posibles vías: la de RAS/MAPK (Eblaghie *et al.*, 2003; Kawakami *et al.*, 2003), y la de PI3K/AKT (Ong *et al.*, 2001).

En la Figura I10 se resumen los principales datos conocidos de los mutantes de estos ligandos y de sus receptores. A partir de dichos fenotipos se pueden destacar algunos hechos relevantes (nótese que su papel distalizante no se va a volver a comentar):

- *Fgf8* es necesario y suficiente para el desarrollo de una extremidad normal. El orden de importancia de los FGFs en la extremidad de ratón es 8>4>9>17 (Mariani *et al.*, 2008).
- La línea Msx2-Cre actúa relativamente antes en la extremidad inferior que en la superior, de tal manera que aquellas mutaciones que implican como mínimo a *Fgf8* y *Fgf4* no tienen ni siquiera un pulso temporal de estos factores en la extremidad inferior, resultando en la ausencia de ésta (Sun *et al.*, 2002).
- La línea RAR-Cre actúa principalmente sobre la extremidad superior y lo hace antes que Msx2-Cre. Por tanto, a igualdad del alelo floxeado, los fenotipos de extremidad superior obtenidos con la línea RAR-Cre se parecen a los de extremidad inferior obtenidos con Msx2-Cre (Lewandoski *et al.*, 2000; Moon y Capecchi, 2000).
- La eliminación de *Fgf8* con la línea Msx2-Cre provoca una extensión y aumento de expresión de *Fgf4* (Lewandoski *et al.*, 2000), que es probablemente responsable del rescate de la

expresión de *Shh* (ver su dinámica de expresión en Figura I10). No obstante, cuando se eliminan más Fgfs, la expresión de *Shh* baja mucho y ya no se mantiene, lo que probablemente contribuye a los truncamientos observados. Resulta curioso que al eliminar *Fgf8* con RAR-Cre la expresión de *Shh* no se recupera, sino que disminuye con el tiempo, pese a que la expresión de *Fgf4* también aumenta (Moon y Capecchi, 2000).

- Además del apagado prematuro de *Shh*, la bajada de señalización FGF desde el AER también tiene como consecuencia que disminuya *Fgf10* en el mesénquima (Moon y Capecchi, 2000; Sun *et al.*, 2002; Boulet *et al.*, 2004), lo que en ocasiones conduce a una regresión prematura del AER. De hecho, el mutante constitutivo de *Fgf10* no tiene primordios de extremidad, o los tiene pero enseguida sufren una degeneración (Min *et al.*, 1998; Sekine *et al.*, 1999).

- Conforme se eliminan más alelos de Fgfs, lo primero que se pierden son estructuras anteriores de zeugopodio y autopodio (Mariani *et al.*, 2008).

- En la mayor parte de los casos, la eliminación de varios FGFs del AER no causa un aumento de apoptosis en el mesénquima distal, que sería lo esperable. Al contrario, en muchas ocasiones el aumento de apoptosis se produce en el mesénquima dorsal proximal (Sun *et al.*, 2002; Mariani *et al.*, 2008). En cuanto a la proliferación, de producirse una bajada significativa, probablemente ocurre más tarde que el resto de eventos celulares (Sun *et al.*, 2002).

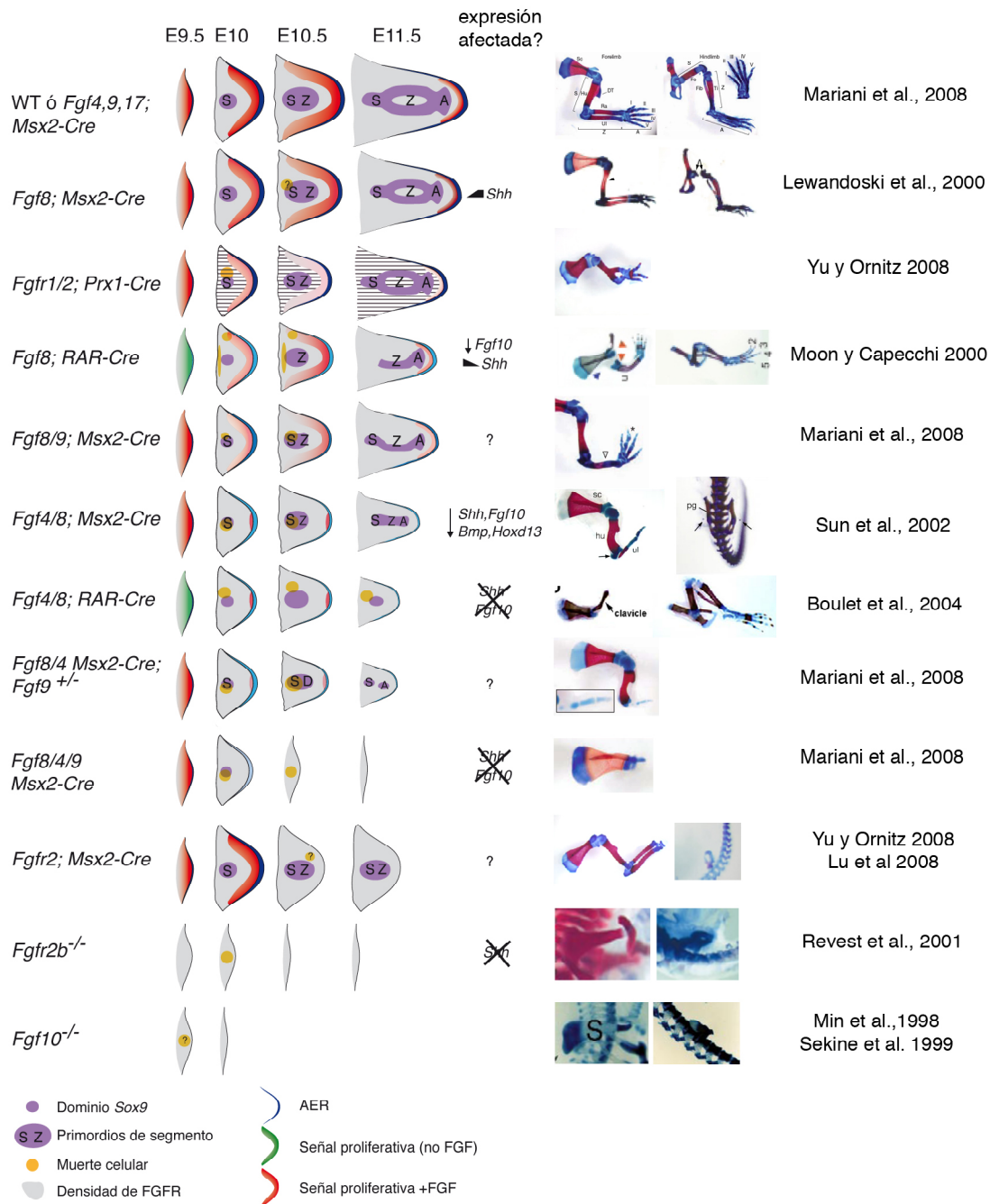
- En muchas de las combinaciones de mutantes, antes de que se aprecien los efectos en la supervivencia celular, el primordio de extremidad ya es más pequeño que el silvestre. Esto llevó a proponer que los FGFs influyen en el tamaño inicial del primordio a través de efectos de quimioatracción de las células del flanco (Sun *et al.*, 2002). De hecho, hay evidencias de que en los primeros momentos de formación del primordio, se producen “corrientes” de células atraídas por diversos factores, como Wnt5a (Wyngaarden *et al.*, 2010). Curiosamente, aunque se han mostrado este tipo de efectos mediante implantación de microesferas de FGF4 y manipulación del AER en el ala de pollo (Li y Muneoka, 1999), el mismo tratamiento parece no tener efecto en el embrión de ratón en cultivo (Wyngaarden *et al.*, 2010).

- La eliminación de *Fgf8* suficientemente temprana causa la pérdida casi completa del estilopodio. No parece tratarse de un problema de especificación, porque la expresión de *Meis1/2* no está afectada (Lewandoski *et al.*, 2000). La explicación más satisfactoria dada hasta el momento es que los FGFs son responsables no sólo del tamaño inicial del primordio, sino de la expansión progresiva de los precursores de cada segmento. Como la expresión de *Fgf4*, *9* y *17* empieza más tarde, la expansión del estilopodio depende sólo de *Fgf8*, por lo que su eliminación afecta principalmente a este elemento (Sun *et al.*, 2002).

- La eliminación de *Fgfr2* en el ectodermo provoca que el AER no pueda responder a FGF10, por lo que esta estructura degenera, en lo que se conoce como ablación genética (Lu *et al.*, 2008; Yu y Ornitz, 2008). Consecuentemente, se producen truncamientos de los elementos distales. Estos se podrían explicar como en el caso de la extirpación quirúrgica en el embrión de pollo, y de hecho, la extirpación quirúrgica en ratón también provoca acumulación de muerte distal (Sun *et al.*, 2002). No obstante, parece no haber consenso en si la ablación genética provoca una disminución de proliferación y un aumento de apoptosis en la zona distal (Yu y Ornitz, 2008), o no (Lu *et al.*, 2008). En el escenario en que esos efectos no tienen lugar, la explicación del fenotipo se basa en considerar al AER como un temporizador para la generación del autopodio. Sin AER, la especificación del autopodio (de acuerdo a la expresión

## I. INTRODUCCIÓN

de *Hoxa13*) se retrasa, por lo que para cuando empieza el proceso de diferenciación, el número de precursores de autopodio es insuficiente y dicho elemento no se forma (Lu *et al.*, 2008).



**Figura 110.** Fenotipos de pérdida de función de FGFs y FGFRs en la extremidad. Basada en la representación utilizada en (Yu y Ornitz, 2008). En la columna de la izquierda se indica la combinación de alelos nulos o floxeados así como la línea Cre utilizada. A continuación, de izquierda a derecha, aparecen representaciones idealizadas de primordios de extremidad de ratón en los estadios indicados. El código de colores indica qué señales y efectos celulares están teniendo lugar. A continuación se indica si la expresión de genes importantes para la formación de patrón está alterada. Finalmente, a la derecha, se muestran ejemplos de los patrones esqueléticos obtenidos con cada mutante (extremidad superior a la izquierda), y la fuente bibliográfica correspondiente. El interrogante (?) indica que el proceso en cuestión no se ha estudiado (apoptosis en mutante de *Fgf10*), o que no hay consenso sobre ese fenómeno (muerte distal en *Fgfr2; Msx2-Cre*). S, Z, A, D = estilopodio, zeugopodio, autopodio, precursor distal. Para algunos mutantes, no todos los datos mostrados están publicados, pero se han extrapolado a partir de mutantes similares o comentarios superficiales en la literatura.

Así pues, el papel de los FGFs producidos por el AER todavía no se comprende del todo. Dado que parece que se necesitan, junto con los Wnts, para mantener el estado indiferenciado y proliferativo del mesénquima distal (ten Berge *et al.*, 2008), resulta sorprendente que varios de los mutantes de falta de función de FGF no presenten defectos de proliferación o aumento de apoptosis en el mesénquima distal. Por otro lado, de su papel instructivo distalizante no parece haber duda, ***si bien su dinámica y/o su posible papel temporizador no ha sido estudiada.***

Como breve apunte evolutivo, es destacable que se han encontrado ortólogos de los genes de *Fgf* en todos los metazoos analizados, incluyendo cnidarios, nemátodos, artrópodos y ascidias, pero no en levaduras o bacterias, por lo que constituyen una de las características de los organismos multicelulares (Itoh y Ornitz, 2004).

- Ácido retinoico.

RA es la forma biológicamente activa de la vitamina A o retinol. Se trata por tanto de una molécula pequeña (300 Da) y con base isoprenoide, que no puede ser sintetizada por el organismo de los metazoos, sino que debe ser ingerida en la dieta (Agadir *et al.*, 1999). Tanto en exceso como en defecto, RA puede causar alteraciones muy importantes del desarrollo (revisado en (Niederreither y Dolle, 2008)). En el caso del embrión de vertebrados ovíparos, la fuente de RA es el  $\beta$ -caroteno (precursor del retinol) almacenado en la yema del huevo. En el caso de los animales placentarios, el embrión recibe los precursores de RA a través de la circulación sanguínea (Satre y Kochhar, 1989). Además de este sistema, es muy probable que haya un almacén de estas moléculas en el embrión temprano, ya que la vía de RA se activa antes de que exista la placenta (revisado en (Niederreither y Dolle, 2008)). Los retinoides, que es como se conoce a este conjunto de moléculas con base química muy similar, son moléculas mayoritariamente lipofílicas (Fig. I11), con una notable capacidad de atravesar membranas. Pese a ello, el extremo de la cadena hidrocarbonada termina en un grupo polar, que puede ser un hidroxilo (-CH<sub>2</sub>OH) en el caso del retinol, un aldehído (-COH) en el caso del retinal (también llamado retinaldehído), o un carboxilo (-COOH) en el caso del ácido retinoico (Fig. I11). Además, puesto que posee varios dobles enlaces en su cadena hidrocarbonada, la distinta configuración *cis* o *trans* de estos enlaces da lugar a varios posibles isómeros. Los más estudiados son el todo-*trans* RA (ATRA en inglés), el 9-*cis* RA y el 13-*cis* RA (los números se refieren a la posición del primer átomo de carbono que participa en el doble enlace cuya forma isomérica se indica). También puede sufrir oxidación (4-oxo RA) y deshidrogenación (3,4 didehidro RA). La mayor parte de las funciones biológicas son realizadas por la forma todo-*trans*. De hecho, algunos isómeros que *in vitro* muestran algún papel, como 9-*cis* RA, o que tienen propiedades teratogénicas cuando se administran farmacológicamente, como 13-*cis* RA o didehidro RA, no parecen existir en cantidades significativas en los embriones de mamíferos o de peces (Horton y Maden, 1995; Costaridis *et al.*, 1996). No obstante, 3,4 didehidro RA resulta ser el retinoide mayoritario en el primordio de extremidad de pollo (Thaller y Eichele, 1990), y en el embrión de *Xenopus* se encuentran cantidades considerables de 9-*cis* RA y 4-oxo RA (Pijnappel *et al.*, 1993; Kraft *et al.*, 1994). En mamíferos adultos, en contraste con los embriones, varios isómeros de RA y sus versiones modificadas están presentes en diversos tejidos (Agadir *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 2002).

En ocasiones el ATRA es transportado en sangre unido a albúmina, y entra directamente en la célula atravesando la membrana (o al menos no se conoce receptor para esta entrada). No obstante, la mayor parte de RA producido por una célula embrionaria entra en ésta en forma de precursor, por lo que debe sufrir una serie de transformaciones químicas (Fig. I11). El  $\beta$ -caroteno entra a través de la proteína de membrana BCO ( $\beta$ -caroteno oxigenasa), que además lo transforma en dos moléculas de retinal. El retinol circulante en sangre, por su parte, es

## I. INTRODUCCIÓN

transportado unido a RBP4 (*Retinol Binding Protein 4*), y a través de la interacción con el transportador STRA6 entra en la célula. Una vez dentro, se une a CRBP (*cytosolic retinol binding protein*), que media su transferencia a enzimas del tipo alcohol deshidrogenasa (ADH1-4) o retinol deshidrogenasa (RDH, por ejemplo RDH10). Estas catalizan la conversión reversible a retinal. A continuación, enzimas del tipo deshidrogenasa de retinaldehído (RALDH1-3) y en ocasiones CYP1B1 (Chambers *et al.*, 2007) catalizan la conversión irreversible a ácido retinoico (revisado en (Agadir *et al.*, 1999; Duester, 2008; Niederreither y Dolle, 2008)). A partir de este punto, RA es secretado y difunde por el espacio intercelular, actuando de modo paracrino. Cuando RA entra en una célula que puede responder a su presencia, existen dos posibles vías. Si en la célula predomina el tipo I de la proteína *Cytosolic Retinoic Acid Binding Protein* (CRABP-I), RA se une a ésta y se dirige a degradación vía CYP26A1-C1, proteínas del retículo endoplasmático pertenecientes a la familia de Citocromo P450. Los metabolitos polares resultantes no participan en señalización (revisado en (Njar *et al.*, 2006)). Si, por el contrario, se une a CRABP-II, queda expuesta una secuencia de localización nuclear en esta proteína, de forma que el complejo entra al núcleo (Sessler y Noy, 2005). Una vez allí, CRABP-II se une a uno de los diversos receptores de RA (RARs), y mediante un proceso de canalización facilita que RA se una al receptor (Budhu y Noy, 2002) (Fig. I11).

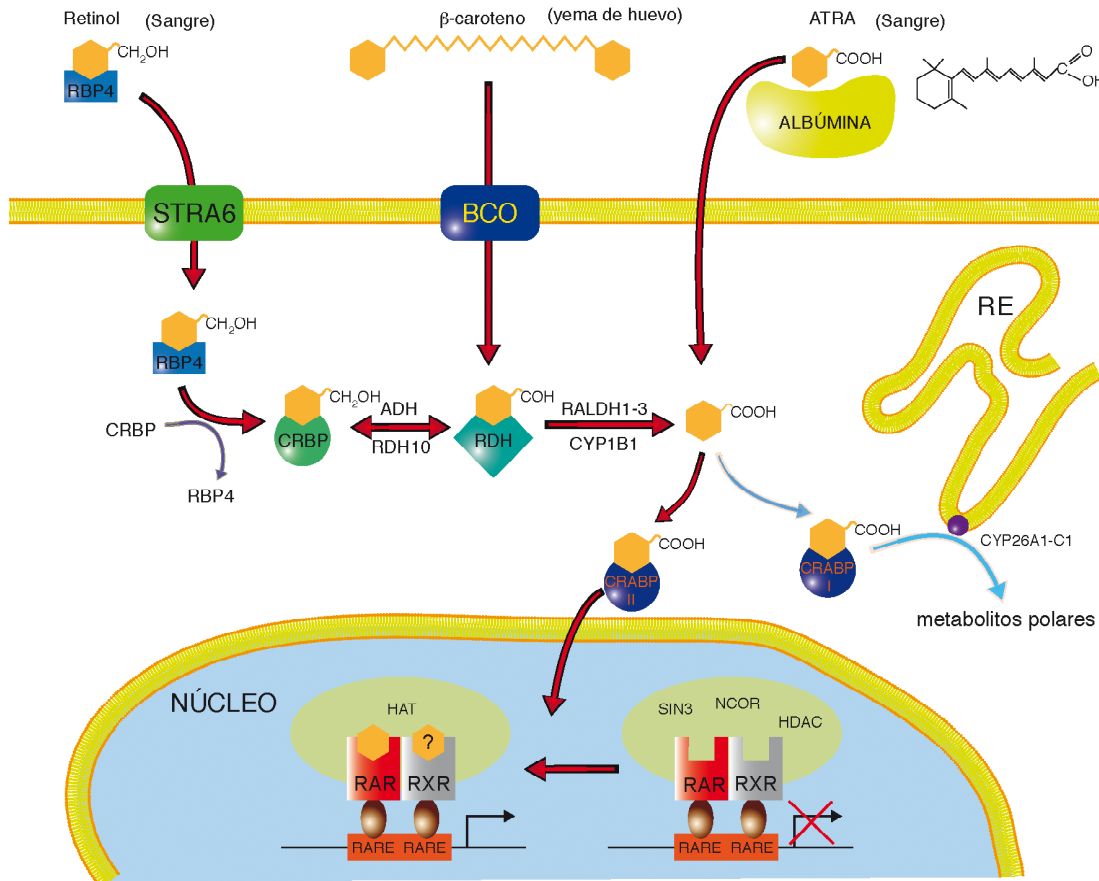
Existen dos tipos de receptores capaces de unir RA: los RARs y los RXRs. En vertebrados hay tres parálogos *Rar* ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) y otros tres *Rxr* ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Además, cada uno de ellos puede experimentar *splicing* alternativo, por lo que existen muchas isoformas capaces de unir retinoides. Estos receptores, además, actúan formando dímeros; los RARs forman heterodímeros con los RXRs, y estos pueden además formar homodímeros consigo mismos. La variedad de combinaciones resultante, junto con la expresión regionalizada de los receptores y sus distintas afinidades por unas secuencias promotoras u otras, son la causa de la diversidad de efectos que RA puede tener en el embrión (revisado en (Dolle, 2009; Mark *et al.*, 2009)). Típicamente, los RARs se unen a ATRA (aunque también pueden hacerlo a 9-*cis* RA (Chambon, 1996)), mientras que se ha visto *in vitro* que los RXRs sólo pueden unirse a 9-*cis* RA. Ahora bien, los RXRs ejercen *in vitro* e *in vivo* funciones tanto dependientes como independientes de ligando (Fujita y Mitsunashi, 1999; Mic *et al.*, 2003), lo que, unido a la ausencia de 9-*cis* RA en algunas especies, sugiere que en muchas ocasiones los RXRs se unen a los RARs como apo-receptores, sin unirse a su ligando. Cuando el complejo RAR-RXR no está unido a su ligando, estos receptores reclutan correpresores transcripcionales a la secuencia promotora a la que están unidos, de modo que la transcripción del gen en cuestión está silenciada. Cuando se unen a RA, el cambio conformacional resultante provoca el reclutamiento de coactivadores transcripcionales, que resultan en la expresión del gen diana (revisado en (Duester, 2008; Niederreither y Dolle, 2008)). Aunque la activación transcripcional es su función mayoritaria, también se han descrito algunos casos de represión transcripcional (Zhao *et al.*, 2009). Curiosamente, una de las dianas es el propio RAR $\beta$  (Sucov *et al.*, 1990).

Las secuencias genómicas reconocidas por los RARs y RXRs se conocen como elementos de respuesta a RA (RARE, en inglés). Consisten en dos motivos hexaméricos centrales (uno para cada receptor del dímero). En la mayor parte de los RARE que están más conservados entre especies, los dos motivos están en la misma orientación (DR, *direct repeat*), y separados por 1, 2 ó 5 nucleótidos (lo que se conoce como motivo DR1, DR2 o DR5, respectivamente) (Balmer y Blomhoff, 2005).

La conversión de retinol a retinal es la reacción limitante del proceso (Chen *et al.*, 1995), y ocurre de forma reversible en todos los tejidos del embrión, aunque distintas regiones



dependen de distintas enzimas (Duester *et al.*, 2003; Sandell *et al.*, 2007). En cambio, la conversión de retinal a RA ocurre de manera irreversible y sólo en algunas regiones, dependiendo de la presencia de las enzimas adecuadas (Duester, 2008; Niederreither y Dolle, 2008). Así, el retinoide mayoritario en los embriones de la mayoría de vertebrados es el retinol (150 – 600 nM dependiendo del estadio y la especie (Thaller y Eichele, 1987; Horton y Maden, 1995)), aunque curiosamente en los peces es el retinal (Costaridis *et al.*, 1996). Por su parte, la concentración de RA en la extremidad es de aproximadamente 25 nM (Horton y Maden, 1995; Mic *et al.*, 2003), así que por lo general el retinol siempre está en gran exceso.



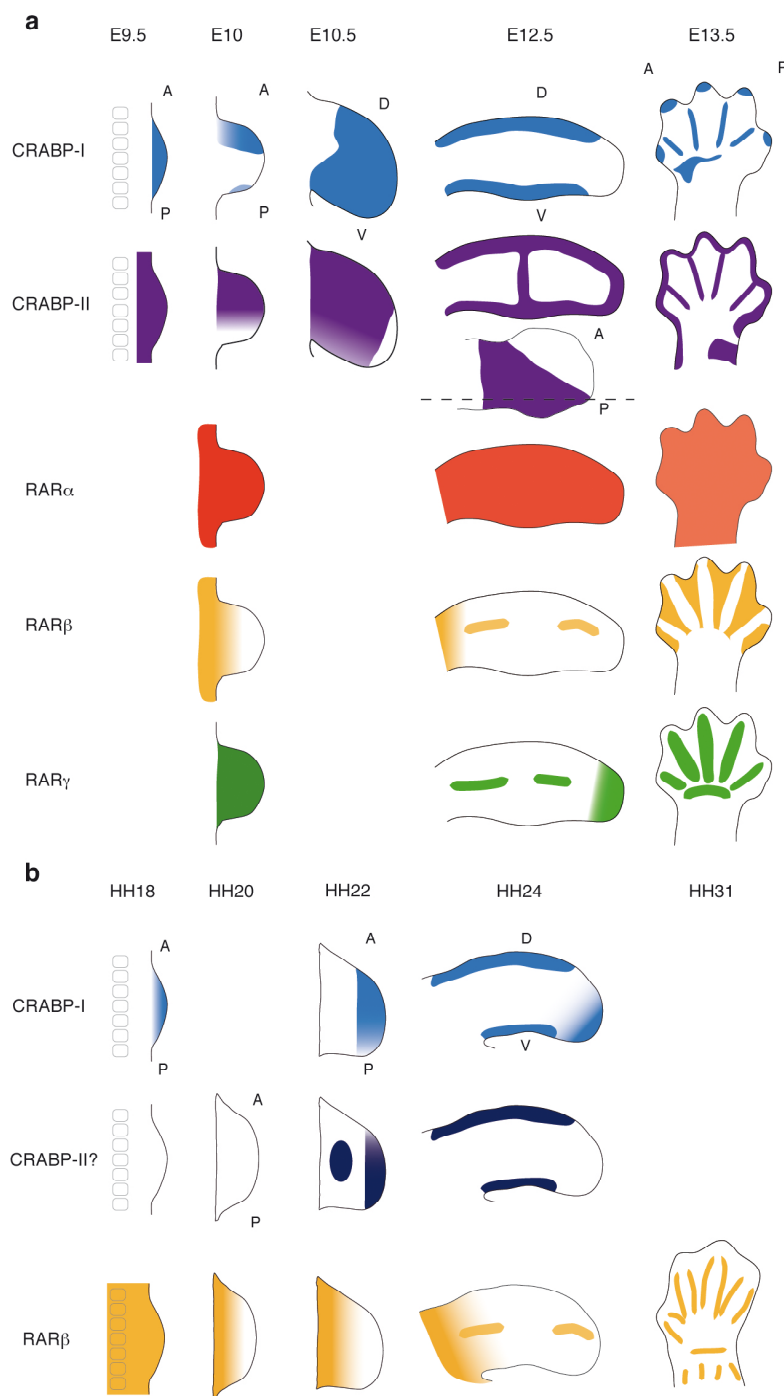
**Figura I11.** Metabolismo y vía de señalización de retinoides. Ver texto principal para los detalles.

Además de la distribución de RA en el embrión, lo que determina qué regiones son más o menos dependientes (o sensibles) a RA es la distribución de las proteínas que lo unen, es decir, RARs, y CRABPs. En el caso de la extremidad, sus patrones de expresión aparecen en la Figura I12 (reconstruidos a partir de (Dolle *et al.*, 1989b; Dolle *et al.*, 1990; Giguere *et al.*, 1990; Smith y Eichele, 1991; Mendelsohn *et al.*, 1992; Ruberte *et al.*, 1992; Fowles *et al.*, 2003)). A pesar de que los patrones de expresión son bastante dinámicos y regionalizados, **todavía no se conoce cuál es la relevancia de este estricto control espacio-temporal.**

En cuanto a los fenotipos derivados de la falta de función de estas proteínas, llama la atención que los mutantes de *Crabp1* y *Crabp2* apenas muestran defectos (salvo una leve polidactilia postaxial en *Crabp2*<sup>-/-</sup>), ni siquiera combinados, a pesar de que no se detecta una tercera actividad CRABP redundante en el primordio de extremidad (Gorry *et al.*, 1994; Fawcett *et al.*, 1995; Lampron *et al.*, 1995). Una posibilidad es que estas proteínas actúen como tamponantes, siendo sólo requeridas cuando la cantidad de RA es muy alta o muy baja en el embrión. No obstante, se ha descrito que los ratones doble mutantes no son más sensibles a un exceso de

## I. INTRODUCCIÓN

RA (Lampron *et al.*, 1995). La sensibilidad a una falta de vitamina A no ha sido comprobada *in vivo*, aunque hay ciertas evidencias *in vitro* que apuntan a que la actividad CRABP se vuelve especialmente necesaria cuando los niveles de vitamina A son bajos (Takase *et al.*, 1986).



**Figura I12.** Patrones de expresión de los factores relevantes en la señalización por RA. A, P, D, V = anterior, posterior, dorsal, ventral. **a**, Expresión de *Crabp1*, *Crabp2*, *Rar $\alpha$* , *Rar $\beta$*  y *Rar $\gamma$*  en la extremidad de ratón, en los estadios indicados. La línea punteada indica el nivel de corte que se enseña en la ilustración superior. **b**, Expresión de *Crabp1*, *Crabp2* y *Rar $\beta$*  en la extremidad de pollo, en los estadios indicados. No se muestra la expresión de *Rar $\alpha$*  ni *Rar $\gamma$* . No se ha encontrado un consenso en la expresión de CRABP-I en el embrión de ratón. Para la figura se ha elegido el patrón descrito más recientemente (Fowles *et al.*, 2003). En cuanto a CRABP-II, también hay datos difíciles de conciliar. Por un lado, llama la atención que de un patrón sobre todo anterior en E10, se pasa a un patrón con sesgo posterior en E12.5. Por otro, aunque inicialmente en pollo se describió la expresión de lo que se llamó CRABP-II (Kitamoto *et al.*, 1988; Miyagawa-Tomita *et al.*, 1992; Maden, 1994), lo cierto es que en las bases de datos genómicas no aparece un ortólogo de *Crabp2*. Por eso aparece con interrogante en la figura. Nótese que en estadios avanzados, la expresión de algunos de estos factores es alternante en dígito-interdígito.

La falta de función de los receptores de RA revela que por lo general la inactivación de uno puede ser compensada por la actividad de otro, de modo que deben mutarse varios a la vez para apreciar un fenotipo alterado (revisado en (Mark *et al.*, 2009)). Cuando se inactivan RAR $\alpha$ 1 y  $\beta$ , no se produce un fenotipo anormal en la extremidad, y los defectos provocados por la suplementación con RA no se ven rescatados (Fig. I13a), lo que revela que la mayor parte de las funciones de RA en la extremidad las realiza RAR $\gamma$  (Luo *et al.*, 1996). No obstante, la eliminación de RAR $\gamma$  sólo provoca defectos con baja penetrancia, a no ser que se inactive junto con otro RAR. Así, el doble mutante  $\alpha/\gamma$  presenta polidactilia preaxial, pérdida de un dedo

posterior, el zeugopodio pierde el radio o el peroné, y la escápula está afectada (Lohnes *et al.*, 1994) (Fig. I13a'). Por otro lado, la expresión interdigital de RAR $\beta$  en estadios avanzados llevó a proponer que la señalización de RA jugaba un papel importante en la muerte y regresión del interdígito (Dolle *et al.*, 1989b). Hoy sabemos que esto es cierto, y que RA interacciona con la señalización FGF y/o la BMP para inducir la muerte y regresión del interdígito (Lee *et al.*, 1994; Dupe *et al.*, 1999; Hernandez-Martinez *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010). Irónicamente, la falta de función de RAR $\beta$  (el único expresado específicamente en el interdígito) no provoca defectos en la regresión de dicha estructura, a no ser que se combine por ejemplo con el mutante de RAR $\gamma$  (Ghyselinck *et al.*, 1997) (Fig. I13a''). Por último, la inactivación de RAR $\alpha$  (que se expresa difusamente en todo el autopodio) provoca en algunos casos la persistencia del interdígito (Lufkin *et al.*, 1993), efecto que se incrementa al combinarlo con otros mutantes (revisado en (Mark *et al.*, 2009)). Además de las vías mencionadas, la vía de Notch también tiene un papel no autónomo, ejercido desde el ectodermo, en este proceso (Pan *et al.*, 2005).

Otras actividades importantes en el embrión son la síntesis y la degradación activa de RA, que en muchas ocasiones ocurren en regiones complementarias. RALDH2 es la principal responsable de la síntesis de RA a lo largo del embrión, comenzando desde la gastrulación, mientras que RALDH1 (restringida al primordio de ojo) y RALDH3 (necesaria para el desarrollo de la fosa olfatoria y el ojo) se expresan más tarde y tienen papeles más secundarios (revisado en (Niederreither y Dolle, 2008)). Con el permiso de CYP1B1, que podría tener algún papel en la generación de RA en la extremidad (Chambers *et al.*, 2007), la mayor parte del RA que afecta a la extremidad es producido por RALDH2. Antes de que exista primordio de extremidad, tanto a nivel de RNA como de proteína, esta enzima se expresa en el mesodermo lateral, así como en los somitos. Más adelante, cuando empieza el crecimiento del primordio de extremidad, ya no se expresa en dicha estructura (salvo en una región marginal proximal), permaneciendo en los somitos (ver Figura I14). En estadios más avanzados, se expresa rodeando los axones motores que invaden el primordio, así como alrededor de los vasos sanguíneos y en un dominio central del autopodio. Este dominio se acaba resolviendo de manera que sólo se ve en el interdígito (Niederreither *et al.*, 1997; Berggren *et al.*, 1999; Swindell *et al.*, 1999; Berggren *et al.*, 2001).

En cuanto a la degradación activa de RA, ya se ha comentado que corre a cargo de las enzimas tipo CYP26. En la extremidad se expresan fundamentalmente dos: CYP26A1 y CYP26B1. La primera está restringida al ectodermo dorsal y ventral, flanqueando el AER, y se expresa antes incluso de que haya crecimiento del primordio (Fujii *et al.*, 1997; Swindell *et al.*, 1999). *Cyp26b1* se expresa por lo general en el mesénquima distal de la extremidad un tiempo después de que haya empezado a crecer (Fig. D2, en la Discusión), aunque en ratón también se expresa en el ectodermo desde el comienzo (MacLean *et al.*, 2001; Reijntjes *et al.*, 2003,2004). Un aspecto interesante de estas enzimas es que su expresión en algunas regiones depende de la cantidad de RA presente. Así, en el modelo de codorniz deficiente en vitamina A, la expresión de *Cyp26b1* está reducida en el tronco y en el primordio de cola (Reijntjes *et al.*, 2003). Por otro lado, la implantación de microesferas cargadas con RA en la región anterior de la extremidad provoca la expresión ectópica de *Cyp26b1* (Martinez-Ceballos y Burdsal, 2001). Esto, unido al hecho de que la expresión de *Raldh2* en la región caudal del embrión está negativamente influenciada por la concentración de RA (Niederreither *et al.*, 1997), sugiere que los niveles de RA están controlados, al menos en parte, por mecanismos de autorregulación.

La polarización inversa de las actividades de síntesis y degradación de RA en la extremidad provocan que esta molécula se distribuya formando un gradiente de concentración de proximal a distal, que se ha podido observar mediante una línea transgénica de ratón que expresa



## I. INTRODUCCIÓN

betagalactosidasa bajo el control de tres RAREs (Rossant *et al.*, 1991; Yashiro *et al.*, 2004). Cuando se altera este sistema altamente regulado de síntesis y degradación, surgen una amplia variedad de fenotipos:

- El mutante de falta de función de *Raldh2* muere a E9.5 – E10.5, exhibiendo un severo retraso (no realiza el *turning*), un acortamiento del eje rostro-caudal y ausencia de primordios de extremidad (Niederreither *et al.*, 1999) (Fig. I13b). El desarrollo de los mutantes se puede rescatar administrando RA a la madre gestante, de manera que cuanto más constante y prolongado es el rescate, más se recupera el desarrollo de la extremidad (Niederreither *et al.*, 2002) (Fig. I13b'). Curiosamente, cuando el rescate es limitado, la extremidad izquierda está mucho más afectada que la derecha. Es destacable que con el sistema de rescate empleado, los niveles de señalización de RA en el primordio de extremidad son muy similares a los endógenos en embriones silvestres (Niederreither *et al.*, 2002) (Fig. I13b'').

- Cuando el rescate del mutante de *Raldh2* es limitado en el tiempo, se llega a formar el primordio de extremidad, aunque presenta defectos de crecimiento y en el establecimiento de sus centros de señalización (Mic *et al.*, 2004) (Fig. I13c). Como era de esperar, si el rescate se prolonga, se rescata también el correcto crecimiento del primordio y la integridad y posición de los centros de señalización, lo que correlaciona con la recuperación de la señalización de RA en el primordio (Fig. I13c'). Esto se interpretó como que RA es necesario en dos fases: en una para la inducción de la extremidad y en la otra como señal próximo-distal necesaria para el correcto establecimiento del AER y por tanto de la ZPA (Mic *et al.*, 2004).

- Un breve rescate con RA da lugar a la formación de extremidades inferiores aparentemente normales. Se hipotetizó que la presencia de RALDH3 en el mesonefros podría ser la causa del mejor desarrollo respecto a la extremidad superior (Fig. I13d). No obstante, el doble mutante de *Raldh2/3*, rescatado del mismo modo, sigue presentando extremidades inferiores normales, pese a que no es posible detectar señalización de RA mediante la línea transgénica de ratón (Zhao *et al.*, 2009). En cuanto a la extremidad superior, si bien no se desarrolla completamente bien, los marcadores del eje P-D y A-P están presentes en ausencia de señal de la línea testigo de RA, sugiriendo que esta molécula no es necesaria para la formación de patrón de ninguna de las extremidades. Merece la pena mencionar que si bien no se detecta actividad de RA mediante la línea testigo, lo cierto es que dianas endógenas de RA, como *Meis2* y *Cdx1*, se pierden en el mutante de *Raldh2* pero se recuperan con el breve rescate (Fig. I13d' y (Zhao *et al.*, 2009)). En cualquier caso, el modelo propuesto en este único trabajo que cuestiona la necesidad de RA para la formación de patrón de la extremidad consiste en que RA sólo es necesario para la inducción de la extremidad superior, a través de la inhibición de *Fgf8* en el mesodermo intermedio (Fig. I13d''). A raíz de este trabajo, resulta evidente que **el papel que RA endógeno juega en la extremidad es una cuestión sin resolver.**

- Experimentos genéticos y con inhibidores químicos en el embrión de pez cebra indican que RA es necesario en dos fases. Primero, en estadios muy tempranos, como una señal permisiva para la inducción del primordio de aleta (a través de *tbx5*), y luego de manera continua para mantener un prepatrón anteroposterior (expresión de *hand2*) hasta que comienza el crecimiento del primordio (Gibert *et al.*, 2006).

- En el embrión de pollo, pese a que no se disponen de mutantes, se ha podido evaluar el papel de RALDH2 mediante la aplicación de inhibidores químicos, como el disulfiram. Si se aplica muy temprano, apenas se forma extremidad, aunque la cintura escapular sí está presente (Stratford *et al.*, 1996) (Fig. I13e, parte superior). Si se aplica más tarde, disminuye la expresión

de *Shh* y *Fgf4*, aunque no la de *Fgf8* (Fig. I13e, parte inferior). El patrón esquelético resulta ser normal, aunque la longitud P-D está disminuida (Stratford *et al.*, 1996).

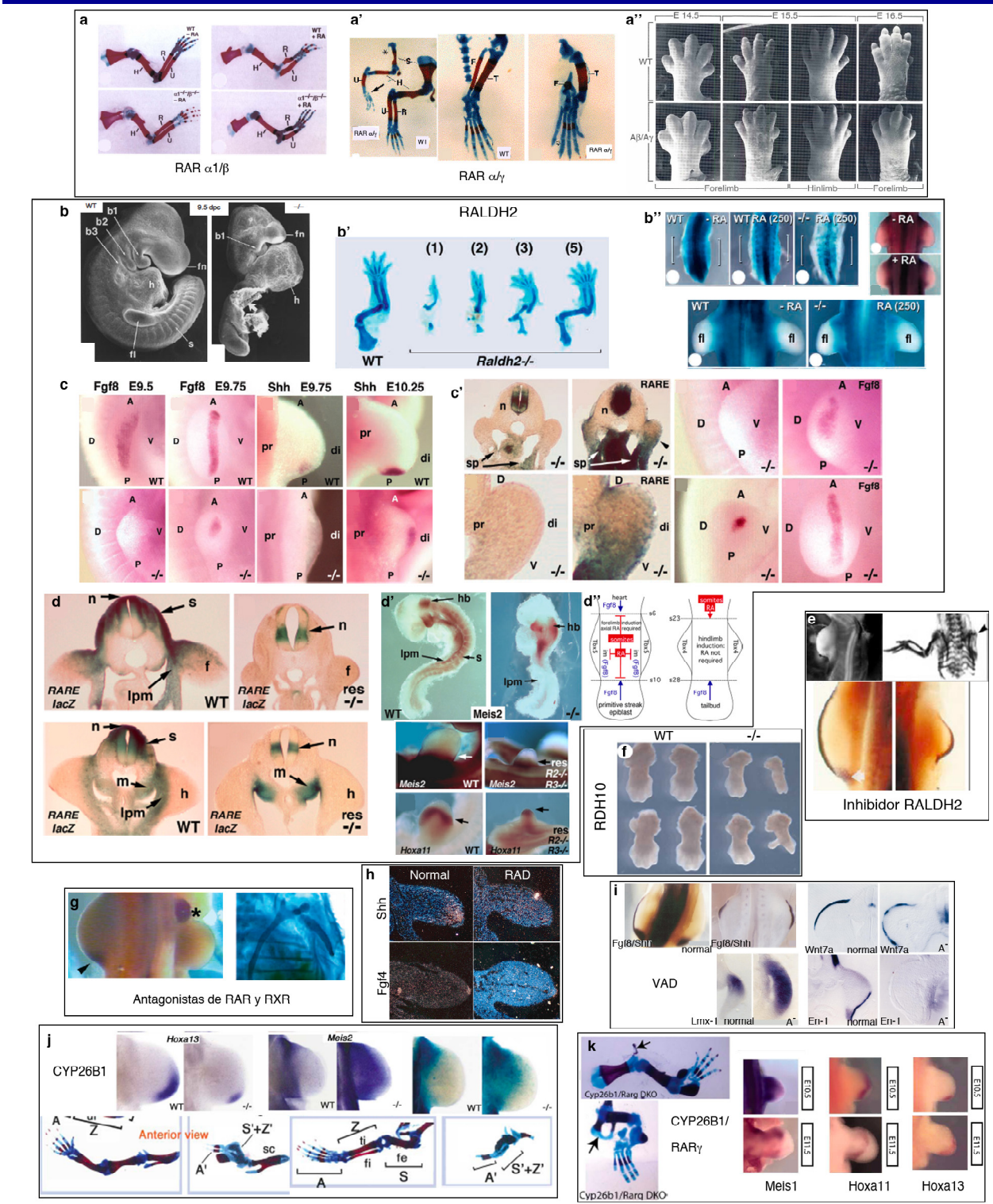
- Otra enzima de la vía que resulta ser importante para el desarrollo de la extremidad es RDH10. Ésta se encarga de la oxidación de retinol a retinal, precursor directo de RA. En el mutante de *Rdh10*, sólo la extremidad superior está afectada. La expresión de *Shh* aparece desplazada hacia distal y anterior, y la expresión de *Fgf8* no se mantiene correctamente. En consecuencia, las extremidades no crecen adecuadamente y carecen de algunos elementos esqueléticos (Sandell *et al.*, 2007) (Fig. I13f).

- Otra forma de afectar la señalización de RA es aplicar antagonistas químicos que compiten por la unión a los receptores, pero no los activan. Si se aplican poco después de la inducción de la extremidad, se producen truncamientos a distintos niveles (Helms *et al.*, 1996) (Fig. I13g, derecha). A nivel molecular, este tratamiento provoca la represión de *Shh* (Fig. I13g, izquierda), lo que llevó a proponer que RA era necesario para el establecimiento de la ZPA (Helms *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1997).

- El modelo de rata deficiente en vitamina A (RAD) presenta algunos defectos en la extremidad, como expresión reducida de *Fgf4*, *Shh* y *Hoxd13*, así como aumento de *Gli3*, pero la iniciación del primordio no se ve afectada (Power *et al.*, 1999) (Fig. I13h). Por su parte, el modelo de codorniz deficiente en vitamina A (VAD) presenta defectos en los ejes A-P y D-V, pero no P-D. Así, la expresión de *Shh* está disminuida o indetectable, *Wnt7a/Lmx1b* se extienden al ectodermo/mesénquima ventral, respectivamente, *En-1* no se expresa, pero *Fgf8* no parece afectado (Stratford *et al.*, 1999) (Fig. I13i).

- Finalmente, el mutante de falta de función de *Cyp26b1* presenta un fenotipo molecular acorde con el supuesto papel proximalizante de RA. Es decir, al expandirse la señalización de RA hacia la región distal, la expresión de *Meis2* se ve expandida también, mientras que la de *Hoxa13* se ve restringida a un dominio distal más pequeño que en el primordio silvestre (Yashiro *et al.*, 2004) (Fig. I13j). Sin embargo, el fenotipo esquelético es difícil de explicar, ya que todos los segmentos están afectados (Fig. I13j), cuando el modelo de dos señales predice que el estilopodio no debería estar afectado. Esto ha sido interpretado como que CYP26B1 no es necesaria para establecer un gradiente de señalización, sino para evitar un efecto teratogénico de RA sobre las estructuras de la extremidad (Zhao *et al.*, 2009). Parece ser que de hecho los dos fenotipos (el de formación de patrón y el teratogénico) ocurren simultáneamente, pero se pueden desacoplar. Si además de inactivar *Cyp26b1* se muta *Rarg*, gran parte de los defectos esqueléticos se rescatan, sobre todo en estilopodio y autopodio, pero la distalización de los marcadores moleculares sigue siendo evidente (Pennimpede *et al.*, 2010) (Fig. I13k). Es muy destacable que el zeugopodio parece ser la estructura más sensible a la alteración de las vías de señalización de RA (Pennimpede *et al.*, 2010) y FGF (Mariani *et al.*, 2008). **Esta característica no ha sido estudiada en detalle hasta el momento.**

**Figura I13 (página siguiente).** Fenotipos resultantes de la alteración de la vía de señalización de RA a distintos niveles. En **a – k**, se indica el gen mutado o el tratamiento utilizado (ver detalles en texto principal). Imágenes tomadas de (Lufkin *et al.*, 1993; Lohnes *et al.*, 1994; Helms *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 1996; Stratford *et al.*, 1996; Ghyselinck *et al.*, 1997; Niederreither *et al.*, 1999; Power *et al.*, 1999; Stratford *et al.*, 1999; Niederreither *et al.*, 2002; Mic *et al.*, 2004; Yashiro *et al.*, 2004; Sandell *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2009; Pennimpede *et al.*, 2010).



Puesto que RA no es una proteína codificada en el organismo, sino una vitamina, una pregunta interesante es **cómo y cuándo surgió su vía de señalización**. Respecto al “cuándo”, hasta hace poco se consideraba que esta vía era una novedad de los cordados, en base al hecho de que no se habían encontrado ortólogos de los genes de los RARs o de las RALDHs en no-cordados (Fujiwara y Kawamura, 2003; Marletaz *et al.*, 2006). Recientemente, sin embargo, se han encontrado evidencias que sugieren que ortólogos de estos genes ya estaban presentes en los primeros deuterostomados o incluso en el antecesor de los bilaterales (Bertrand *et al.*, 2004; Canestro *et al.*, 2006; Simoes-Costa *et al.*, 2008), y también se han hallado retinoides (como 9-*cis* RA y ATRA) en los embriones de estos organismos (Dmetrichuk *et al.*, 2008). Esta



nueva perspectiva resultará probablemente muy útil para esclarecer si conceptos como el de homología profunda (*deep homology*) tienen sentido en el caso de la extremidad. El “cómo” es todavía más desconocido, aunque se han hecho especulaciones interesantes. Se sabe que los invertebrados usan enzimas del tipo citocromo P450 para degradar compuestos químicos endógenos o ambientales. Si, durante la evolución, la expresión de alguno de estos enzimas quedó bajo el control de un sistema ancestral de formación de patrón rostro-caudal, pasaría a expresarse con un patrón A-P concreto. Cualquier sustancia degradada por esta enzima con expresión regionalizada pasaría entonces a formar un gradiente en el embrión, abriendo la posibilidad de utilizar dicha sustancia como una clave posicional. El refinamiento posterior, como “adquirir” una enzima que sintetizara dicha sustancia para producir gradientes más elaborados, sólo sería cuestión de tiempo (White *et al.*, 2007).

- Wnts. Relación con BMPs.

A pesar de que no se han estudiado en esta tesis, resulta interesante revisar una vía de señalización tan conservada como la de Wnt. El nombre proviene de la fusión entre *wingless* (un gen de polaridad segmental en *D. melanogaster*) e *Int* (el nombre que inicialmente se dio a estos factores en vertebrados antes de descubrir que eran homólogos de *wingless*). Los Wnts son ligandos secretados que cuando se unen a su receptor de membrana (Frizzled y LRP), pueden desencadenar la actividad de dos tipos de vías: canónica y no canónica (revisado en (Grigoryan *et al.*, 2008)). Betacatenina ( $\beta$ cat) tiene un papel fundamental en la vía canónica. Esta proteína puede actuar de dos maneras: una estructural, uniéndose a cadherinas, y otra de señalización. En ausencia de señalización Wnt,  $\beta$ cat es degradada como consecuencia de su interacción con el complejo GSK3 $\beta$ -Axin/Conductin-APC. Sin embargo, la señalización Wnt estabiliza  $\beta$ cat secuestrando Axin del complejo, de modo que  $\beta$ cat puede entrar al núcleo y unirse a los activadores transcripcionales Tcf y Lef, desplazando al inhibidor Groucho. Esto activa la transcripción de los genes diana (ver (Grigoryan *et al.*, 2008) y las referencias mencionadas allí). Hay dos vías no canónicas: activación de las quinasas Jun, y la vía Wnt/Ca<sup>2+</sup>.

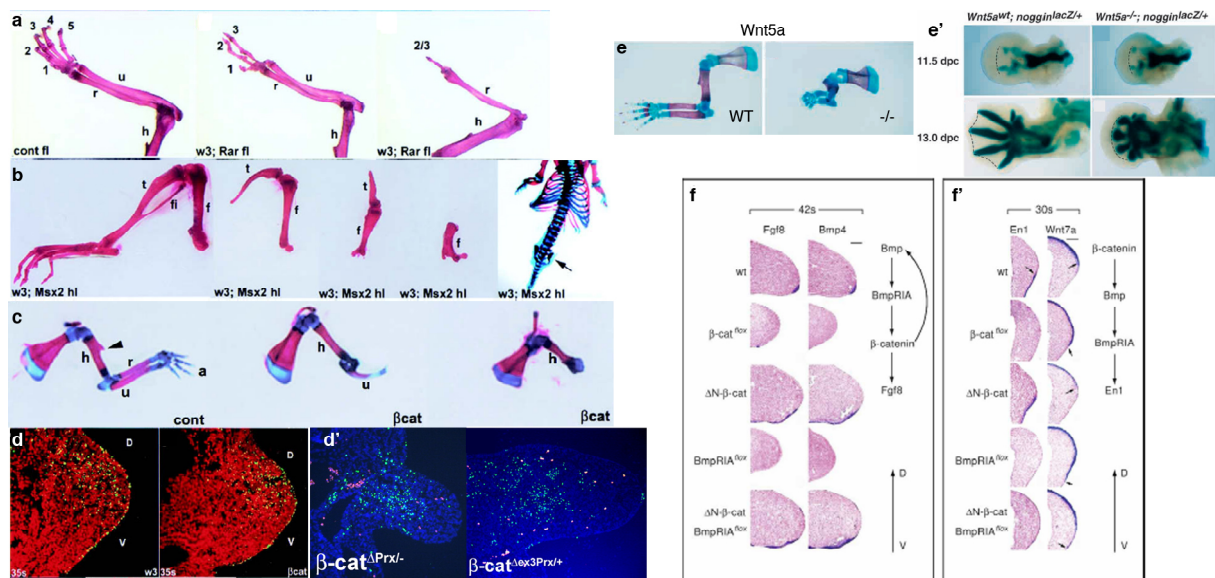
Ya se ha comentado que, además de su papel en la inducción del primordio de extremidad y en el mantenimiento de un estado indiferenciado y proliferativo, los Wnts resultan fundamentales para el establecimiento del eje D-V y el crecimiento P-D mantenido:

- La eliminación de  $\beta$ cat en el ectodermo mediante la línea Msx2-Cre (Barrow *et al.*, 2003) o Brain4-Cre (Soshnikova *et al.*, 2003), conduce con frecuencia al truncamiento de la extremidad, al igual que si se elimina Wnt3 en el ectodermo (Fig. I14a – c). En los casos menos afectados, la extremidad se forma, pero es doblemente dorsal a nivel de expresión molecular y/o anatómico (Barrow *et al.*, 2003; Soshnikova *et al.*, 2003). Estos mutantes presentan defectos en la formación y mantenimiento del AER, pero no se debe a un defecto en las propiedades de adhesión de las células de esta estructura, ni a un fallo en la inducción de *Fgf10* en el mesénquima, aunque sí es cierto que la expresión de *Fgf10* no se mantiene en el tiempo. Los truncamientos en el eje P-D probablemente se explican por un aumento de apoptosis en el mesénquima distal y en el ectodermo, aunque éste aumento no ocurre inmediatamente como en la eliminación quirúrgica del AER, sino con cierto retraso (Barrow *et al.*, 2003) (Fig. I14d). Muchos de estos fenotipos son reminiscentes del mutante de falta de función de BmpR-IA (Ahn *et al.*, 2001). De hecho, al analizar la relación epistática entre estas dos vías, se encontró que en lo que respecta al eje P-D (mantenimiento de *Fgf8*),  $\beta$ cat actúa como mediador de la señalización de BMP (aunque también retroalimenta el sistema induciendo expresión de varias Bmps), mientras que en el D-V (expresión de *En-1*)  $\beta$ cat está por encima de Bmps (Barrow *et al.*, 2003; Soshnikova *et al.*, 2003) (Fig. I14f y f').

## I. INTRODUCCIÓN

- La eliminación o ganancia de función de  $\beta$ cat en el mesénquima mediante la línea Prx1-Cre también causa defectos en el AER o su regresión prematura, respectivamente, lo que conduce a truncamientos (Hill *et al.*, 2006). Nuevamente, la expresión de varias Bmps está alterada y participa en el fenotipo. Resulta interesante que la pérdida o ganancia de función de  $\beta$ cat en el mesénquima provoca un incremento tardío de apoptosis en el mesénquima proximal de la extremidad (Fig. I14d'), al igual que ocurre con los mutantes de FGF en el AER. Además, la expresión de *Lmx1b*, que normalmente depende de WNT7A a través de la vía no canónica, también se ve afectada en la misma dirección que  $\beta$ cat. Es decir, la falta de función de  $\beta$ cat en el mesénquima provoca la disminución de la expresión de *Lmx1b*, y viceversa. Esto además ocurre sin afectar la expresión de *Wnt7a* o *En-1*, sugiriendo que la vía canónica de Wnt participa directamente en el proceso (Hill *et al.*, 2006).

- *Wnt5a* tiene un papel importante en la región distal del mesénquima. Su expresión comienza en el ectodermo ventral, luego el AER, y finalmente se expresa en el mesénquima, en un gradiente de distal a proximal, mientras que la expresión ectodérmica se pierde (Yamaguchi *et al.*, 1999). El mutante de falta de función presenta un defecto general en todas las estructuras con polos de crecimiento (morro, lengua, extremidades, tubérculo genital). En la extremidad, el reclutamiento inicial de células al primordio está afectado (Wyngaarden *et al.*, 2010), el estilopodio y zeugopodio están acortados y las falanges distales ausentes (Fig. I14e). Los precursores de las condensaciones se forman bien, pero luego no crecen lo suficiente (Fig. I14e'). Marcadores moleculares como *Fgf8*, *Hoxa11* y *Hoxa13* se expresan correctamente, pero a partir de E12.5 se observa en el dominio distal una disminución de proliferación que podría explicar el fenotipo (Yamaguchi *et al.*, 1999). Hay evidencias de que WNT5A, actuando a través de la vía no canónica Wnt/Ca<sup>2+</sup>, promueve la degradación de  $\beta$ cat, disminuyendo la señalización canónica en la región distal. Este control fino de la actividad de la vía canónica es necesario para la correcta condrogénesis y proliferación de la zona distal de la extremidad (Topol *et al.*, 2003).



**Figura I14 (página anterior).** Fenotipos derivados de la pérdida o ganancia de función de diversos Wnts/ $\beta$ cat. **a** y **b**, Gradación de fenotipos ocasionados por la pérdida de *Wnt3* en el ectodermo de la extremidad superior (**a**) o inferior (**b**). Nótese que los truncamientos son más graves en la extremidad inferior. **c**, Truncamientos provocados por la pérdida de  $\beta$ cat en el ectodermo de la extremidad superior. Estos mutantes carecen de extremidad inferior. **d**, Distribución de células apoptóticas (verde) en extremidades de estadio E10.5 que carecen de *Wnt3* (izquierda) o  $\beta$ cat (derecha) en el ectodermo. **d'**, Lo mismo, pero con la pérdida de  $\beta$ cat (izquierda) o su ganancia de función (derecha) en el mesénquima. **e**, Fenotipo esquelético de extremidades *Wnt5a*<sup>-/-</sup>. **e'**, Comparación del tamaño y extensión de las condensaciones precondrogénicas en extremidades silvestres y *Wnt5a*<sup>-/-</sup>, según se indica. **f** y **f'**, Esquemas que resumen la relación epistática entre  $\beta$ cat y Bmps para la inducción y mantenimiento de *Fgf8* (izquierda), y para la expresión de *En-1* (derecha). Imágenes en **a**–**d** obtenidas de (Barrow *et al.*, 2003), **d'** de (Hill *et al.*, 2006), **e** y **e'** de (Yamaguchi *et al.*, 1999), **f** y **f'** de (Soshnikova *et al.*, 2003)

#### I.2.5.7 Propiedades de adhesión en la extremidad.

Muchos de los procesos morfogénicos en la extremidad requieren que las células sean capaces de distinguirse unas de otras en cuanto a sus propiedades de adhesión. Por ejemplo, la formación de condensaciones precondrogénicas implica que una subpoblación de células se unen entre sí con más afinidad que con el resto de células mesenquimales, y es concebible que la separación entre los distintos segmentos de la extremidad implique mecanismos de repulsión celular intersegmental. Además, la migración de poblaciones celulares que invaden el primordio, como precursores musculares, endoteliales o axones, requieren con toda seguridad la existencia de mecanismos similares. Este tipo de mecanismos pueden funcionar de dos maneras distintas: atracción entre células que comparten un mismo repertorio molecular, o repulsión entre las células que tienen distintos códigos de adhesión.

Hay dos tipos de mecanismos principales involucrados en la adhesión celular: dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  o independientes (Thomas *et al.*, 1981; Bee y von der Mark, 1990). Estudios tempranos aseguraban que la vía dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  está más extendida en el primordio de extremidad (Thomas *et al.*, 1981), y de hecho moléculas como N-cadherina, Cadherina11 y N-CAM se expresan en esta estructura (Fig. I15).

Para tener algún papel, estas propiedades de adhesión deben estar regionalizadas, es decir, es necesario que distintas regiones del primordio de extremidad tengan distintos repertorios (cuantitativa o cualitativamente) de moléculas de adhesión. En efecto, cuando se mezclan células pertenecientes a distintas regiones P-D de primordios de un mismo estadio, se observa una tendencia a la formación de grupos grandes de células de un mismo origen, en lugar de una mezcla homogénea de las células de ambos orígenes (Ide *et al.*, 1994). Lo mismo ocurre con células provenientes de distintos niveles del eje A-P. Es más, si se mezclan células pertenecientes a la misma región distal de la extremidad pero de estadios distintos, también se observa esa segregación (más conocida como *sorting out*), indicando que las propiedades de adhesión evolucionan con el tiempo de desarrollo (Ide *et al.*, 1994). Esto llevó a proponer un modelo en el que la dinámica espacio-temporal de las propiedades de adhesión provoca una regionalización del primordio de la extremidad, de modo que luego los elementos cartilaginosos se forman en el centro de cada región. Una posibilidad muy atractiva es que la expresión de estas moléculas de adhesión esté controlada por los genes *Hox*, cuya expresión sigue una dinámica espacio-temporal comparable a la de las propiedades de adhesión. Además, parece que *in vitro* algunos genes *Hox* controlan positiva o negativamente la expresión de N-CAM (Jones *et al.*, 1992), la sobreexpresión de *Hoxa13* confiere a células del primordio temprano unas propiedades de adhesión distintas a las que les corresponderían (Yokouchi *et al.*, 1995), y las células distales de extremidades *Hoxa13*<sup>-/-</sup> pierden la capacidad de agregarse *in vitro* para formar nódulos de cartílago (Stadler *et al.*, 2001). No obstante, estas propiedades no pueden

## I. INTRODUCCIÓN

---

dependen exclusivamente de los genes *Hox*, porque las células distales de estadio HH24 segregan de las de HH26, pese a que comparten el mismo código *Hox* (Ide *et al.*, 1994).

Es destacable que durante la regeneración de la extremidad en anfibios, también parece operar un código de adhesión. Así, si se juntan en cultivo células de un blastema proximal y células de un blastema distal, aquellas tienden a rodear a estas últimas, en un comportamiento conocido como *engulfing* (Nardi y Stocum, 1984). El hecho de que sean las células distales las que forman un núcleo compacto, mientras las proximales las rodean, se ha interpretado como que las células distales no sólo tienen unas propiedades de adhesión distintas a las proximales, sino que a nivel absoluto se adhieren entre sí más fuertemente que las proximales entre sí. Otro fenómeno que se ha descrito en este modelo de regeneración consiste en que cuando se transplanta a una región proximal un blastema que va a formar estructuras distales, se observa un “movimiento” del blastema hacia regiones distales. Una vez que llega al nivel P-D del que procede, detiene su movimiento. Resulta muy interesante que si el blastema se trata con RA, ya no experimenta este movimiento, sugiriendo que sus propiedades de adhesión se han proximalizado (Crawford y Stocum, 1988a).

A continuación se describe el papel de algunas moléculas importantes de este sistema. En la extremidad, N-cadherina se expresa en dos poblaciones distintas: el mesénquima distal y los precursores musculares (Fig. I15). En el mesénquima distal, la expresión de N-cadherina se va incrementando con el tiempo, y para esta evolución temporal parece ser necesario el AER (Yajima *et al.*, 1999). Es más, la aplicación de RA bloquea dicho aumento progresivo de la expresión de N-cadherina, en un nuevo ejemplo de antagonismo entre esta molécula y las señales del AER (Yajima *et al.*, 1999). Si se bloquea la actividad de N-cadherina con un anticuerpo específico, se inhibe la segregación entre células obtenidas de distintos estadios, y si N-cadherina se sobreexpresa en las células del primordio temprano de extremidad, éstas adquieren propiedades de adhesión más tardías/distales (Yajima *et al.*, 1999; Yajima *et al.*, 2002). Es destacable que si bien la sobreexpresión de *Hoxa13* no parece afectar los niveles de N-cadherina, TGF $\beta$ 2 (una molécula relevante durante la condrogénesis) sí que controla su expresión (Miura y Shiota, 2000). A partir de estos trabajos con N-cadherina se propuso un modelo en el que tempranamente, la expresión modular de los genes *Hox* regionaliza las identidades del primordio de extremidad, y después, en el contexto de cada región, los diferentes niveles de N-cadherina determinan las diferentes propiedades de adhesión que conducen a la distinta forma y número de elementos en cada segmento (Yajima *et al.*, 2002). Obviamente, otras moléculas de expresión regionalizada, como Cadherina11 y el sistema Eph/Ephrin (ver más adelante), podrían participar en el proceso. De hecho, está comprobado que *in vitro*, las células que expresan Cadherina11 segregan de las que no lo hacen, llegando a envolverlas (Kimura *et al.*, 1995). Teniendo en cuenta que la expresión de Cadherina11 es mayoritariamente distal en la extremidad (Fig. I15), este fenómeno es muy reminiscente del *engulfing* que se ha comentado en el párrafo anterior.

En el transcurso del estudio del fenómeno de *sorting out*, Wada y colaboradores descubrieron que si el cultivo celular se trata con PI-PLC (fosfolipasa C específica de fosfatidil-inositol), se bloquea la segregación entre células de distintos niveles P-D o entre células del mismo nivel P-D a distintos estadios (Wada *et al.*, 1998). Curiosamente, la segregación entre células provenientes de distintos niveles A-P no se ve afectada, sugiriendo que en este caso opera un mecanismo distinto. Es destacable que moléculas como N-CAM o T-cadherina están unidas a membrana mediante enlaces GPI (Glicosil-fosfatidil-inositol), por lo que su actividad se pierde al tratar con PI-PLC.

Otras proteínas unidas por puentes GPI pertenecen al sistema Eph/efrina. Se trata de un sistema de señalización en el que tanto los receptores (Eph) como los ligandos (efrinas) están asociados a membrana. Sus efectos en el comportamiento celular están mediados a través del citoesqueleto (ver (Wada *et al.*, 2003)), aunque también se ha descrito que la interacción Eph/efrina inhibe la vía Ras/MAPK, provocando un efecto antimitogénico en algunos tipos celulares (Miao *et al.*, 2001). Los Eph pertenecen a la superfamilia de los receptores tirosina kinasa, y a su vez se dividen en dos subfamilias: la familia A, que se une generalmente a efrinas tipo A (unidas a la membrana a través de puentes GPI), y la familia B, que se une exclusivamente a efrinas tipo B (proteínas integrales de membrana). Existen 8 receptores EphA, 6 EphB, 5 efrinas A y 3 efrinas B. Este sistema de señalización juega un papel fundamental en el establecimiento de bordes entre distintas estructuras adyacentes, como los rombómeros. Eph y efrinas se suelen expresar de un modo complementario en estas estructuras adyacentes, por lo que las interacciones que controlan el comportamiento celular ocurren en la interfase (revisado en (Holder y Klein, 1999)). El papel de este sistema en la guía axonal o la migración de células de cresta neural a través de los somitos se conoce bastante bien y está basado en un efecto de repulsión celular. No obstante, su papel en la morfogénesis de la extremidad no está tan claro. En la Figura I15 aparecen resumidos los patrones de expresión descritos para algunos Eph y efrinas. Esta expresión es extraordinariamente dinámica, y sólo en algunos casos y/o estadios se puede asignar a estructuras o tejidos concretos, como los tendones, los vasos o las condensaciones de los dedos. Además puede variar significativamente entre pollo y ratón. Quizá éstas sean las razones por las que **el papel del sistema Eph/efrina en la morfogénesis de la extremidad no termina de comprenderse**.

En cuanto a la función y regulación de estas moléculas en la extremidad, estos son los datos más relevantes:

- La segregación de células de distintos estadios/localizaciones en el eje P-D es inhibida si el cultivo celular se trata con un anticuerpo neutralizante contra EphA4 (Wada *et al.*, 1998).
- La expresión mayoritariamente distal de *Epha4* depende del AER, como demuestra su pérdida de expresión cuando el AER es eliminada (Patel *et al.*, 1996; Wada *et al.*, 2003). Este efecto se rescata al implantar una microesfera de FGF (Patel *et al.*, 1996; Wada *et al.*, 2003). Además, dichas microesferas pueden activar *Epha4* en la zona proximal de la extremidad, pero sólo si se implantan en la región posterior (Patel *et al.*, 1996). Por otro lado, la implantación de microesferas cargadas con RA en la parte distal provoca una disminución de la expresión de esta molécula (Patel *et al.*, 1996). La sobreexpresión de *Meis1* también podría tener este efecto (Nadia Mercader, comunicación personal).
- Por otro lado, La transcripción de *Epha3* y *4* está regulada negativamente por HOXA13 y HOXD13, y positivamente por SALL1 y SALL3. De hecho, los factores SALL (que se expresan en la región distal) y los HOX13 compiten por la unión a una secuencia reguladora de *Epha4* (Kawakami *et al.*, 2009).
- El mutante de falta de función de *Epha4* no tiene fenotipo en la extremidad, aunque su locomoción está afectada debido a defectos en la migración de axones que inervan esta estructura (proyección corticoespinal) (Dottori *et al.*, 1998).
- Salvo una transitoria expresión en el AER, la característica principal de la expresión de *Epha7* es su restricción al mesénquima dorsal. Si se elimina el ectodermo dorsal de la extremidad antes de HH23, la expresión de *Epha7* se pierde antes incluso que la de *Lmx1b*, sugiriendo que



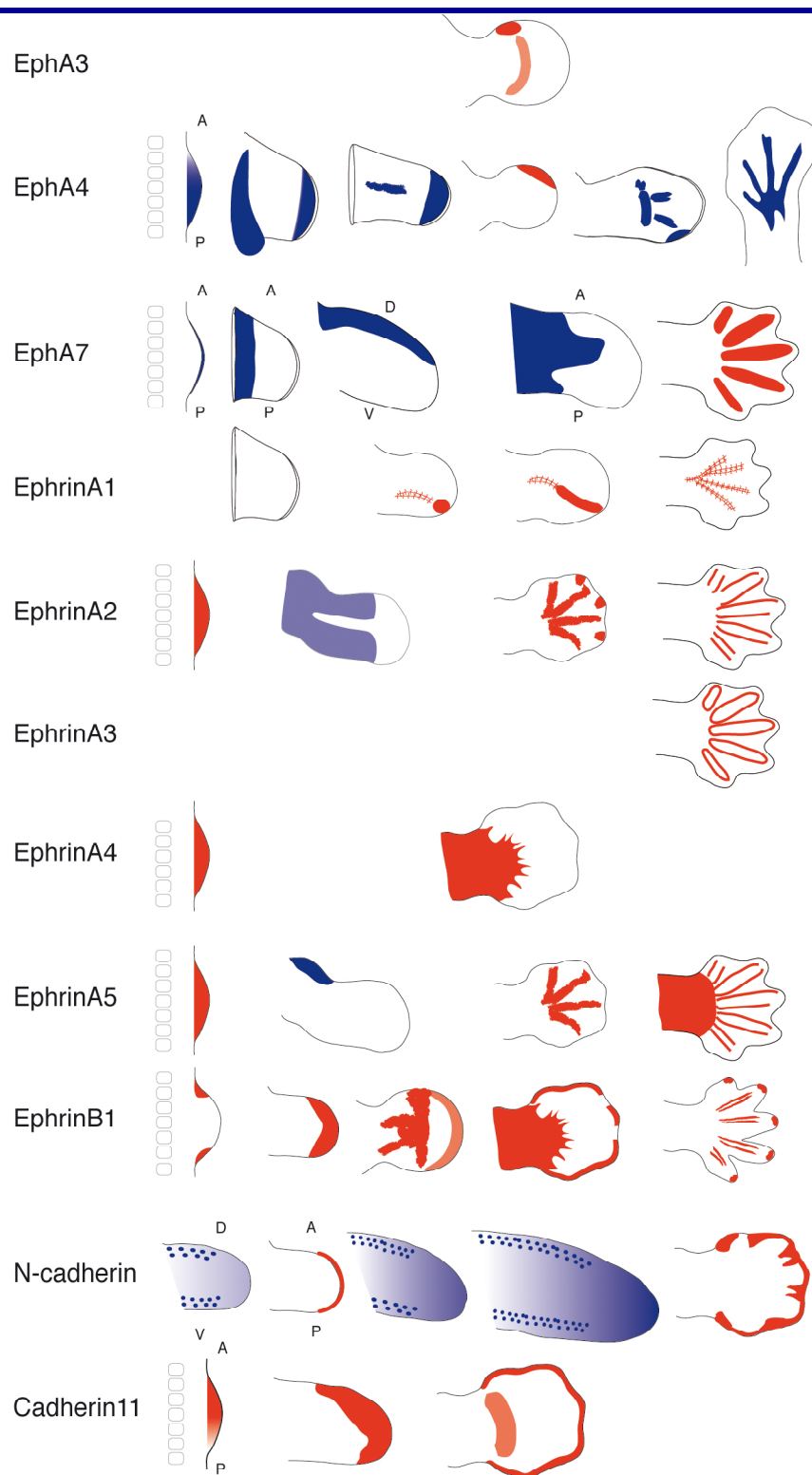
## I. INTRODUCCIÓN

depende de señales del ectodermo (Araujo *et al.*, 1998). Además, la sobreexpresión de *Meis1* podría provocar la expansión distal del dominio dorso-medial (Nadia Mercader, comunicación personal). La migración de los axones entrantes en la extremidad dorsal evita las regiones de expresión de *Epha7*, bifurcándose incluso para rodear dichas regiones. De hecho, otra consecuencia de la eliminación del ectodermo dorsal es que la inervación dorsal del primordio se ve alterada (Araujo *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta que esos axones producen EphrinA5, un posible ligando de EphA7, se propuso que este receptor participa en el sistema de guía axonal de la extremidad.

- La expresión de *EphrinA2* en estadios tempranos es mayoritariamente proximal e intermedia (Fig. I15). Parece depender de las mismas señales relevantes para la formación de patrón P-D, ya que, si se elimina el AER o se sobreexpresa *Meis1*, su expresión se extiende hacia distal, efecto que en el primer caso se revierte si se implanta una microesfera con FGF ((Wada *et al.*, 2003) y Nadia Mercader, comunicación personal). En cuanto a su papel funcional, si se sobreexpresa mediante infección viral en las células de la extremidad, éstas tienden a agruparse y formar parches (Wada *et al.*, 2003). Esto se observa también *in vitro*, cuando se mezclan células distales de HH25 infectadas con no infectadas. Además, al añadir al cultivo la fracción soluble de EphA4 (que interfiere con la unión Eph/efrina), el *sorting out* se bloquea (Wada *et al.*, 2003). Resulta interesante que cuando se mezclan células de HH20 infectadas con no infectadas, no se produce la segregación, probablemente porque todas las células del cultivo expresan *EphrinA2* (ver expresión en estadios tempranos en Fig. I15). A nivel esquelético, la sobreexpresión de *EphrinA2* en la extremidad provoca, con frecuencia moderada, dedos fusionados o bifurcados, y a veces falanges truncadas. En general todos los defectos afectan al autopodio, donde normalmente no se expresa esta molécula (Wada *et al.*, 2003).

- Otra molécula unida por puente GPI, importante en las propiedades de adhesión, es Prod1. Durante regeneración en salamandra y tritón, esta molécula es más abundante en los blastemas proximales que en los distales, y es una diana de RA (da Silva *et al.*, 2002). Además, el bloqueo de Prod1 provoca una pérdida de las características proximales de adhesión, y su sobreexpresión provoca que las células distales se relocalicen hacia posiciones proximales (da Silva *et al.*, 2002; Echeverri y Tanaka, 2005). Esta molécula resulta por tanto clave en el sistema de información posicional. Sin embargo, parece no existir ortólogo de Prod1 en otros vertebrados (Garza-García *et al.*, 2009), lo que probablemente dificultará conseguir la anhelada terapia de regeneración de la extremidad.

En definitiva, pese a que se ha estudiado bastante la función y regulación de este sistema de señalización, su papel endógeno en la migración axonal parece estar **más claro que su posible papel en la morfogénesis de la extremidad**. Los efectos en adhesión intercelular que podrían participar en la regionalización de la extremidad se han visto en condiciones concretas de cultivo o mediante la sobreexpresión desmesurada *in vivo*, pero no en el contexto fisiológico. Uno no puede evitar preguntarse si se están estudiando las moléculas adecuadas.



**Figura I15.** Patrones de expresión de varias proteínas de adhesión en el primordio de extremidad. De izquierda a derecha se muestran representaciones idealizadas de primordios de extremidad en estadios crecientes. Las regiones coloreadas (azul para pollo, rojo para ratón) corresponden a los principales dominios de expresión de la molécula indicada en la columna de la izquierda. La intensidad de coloración refleja los niveles relativos de expresión. La forma del trazo (difuso, reticulado, definido), refleja el tipo de patrón descrito, y suele correlacionar con la estructura en que hay expresión. El patrón punteado de N-cadherina corresponde a precursores musculares. El eje P-D discurre de izquierda a derecha, salvo uno en el que los dedos apuntan hacia arriba (EphA4 de pollo). A, P, D, V = anterior, posterior, dorsal, ventral.

Los datos de expresión se han obtenido de: (Kimura *et al.*, 1995; Flenniken *et al.*, 1996; Patel *et al.*, 1996; Araujo *et al.*, 1998; Stadler *et al.*, 2001; Yajima *et al.*, 2002; Wada *et al.*, 2003; Kawakami *et al.*, 2009).

### I.2.6 Evolución de la extremidad. Homología clásica y profunda.

Las extremidades de artrópodos y vertebrados han sido probablemente clave para una radiación adaptativa sin precedentes (Shubin *et al.*, 1997). Pese a que su evolución no es el tema principal de esta tesis, algunos conceptos básicos ayudarán a situar mejor los resultados obtenidos.

## I. INTRODUCCIÓN

---

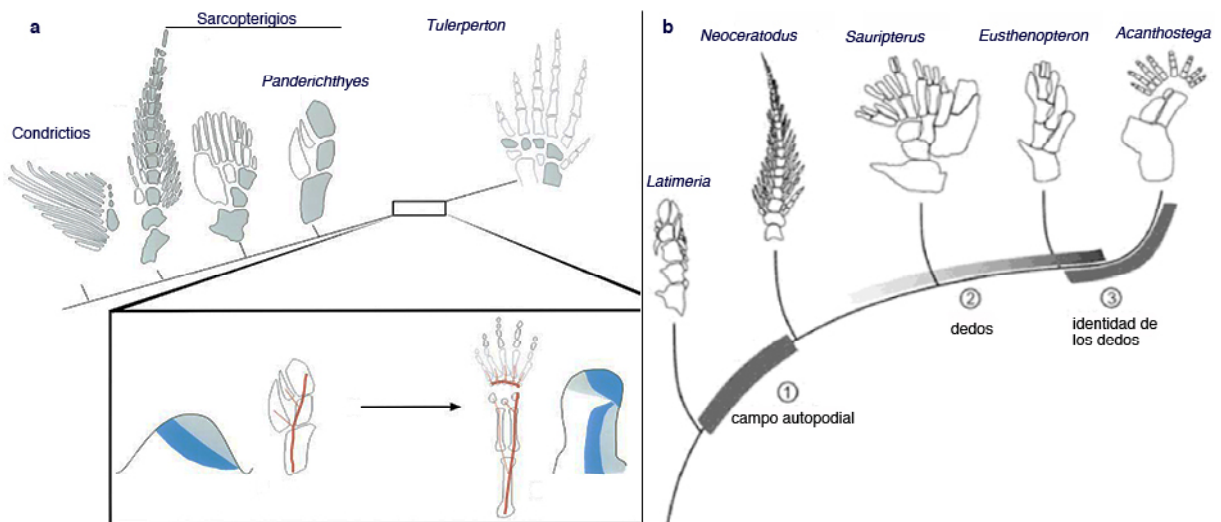
### I.2.6.1 Vertebrados (ver capítulo 4 de (Hall, 2007)).

En el competitivo ambiente de hace más de 450 millones de años (M.a.), la adquisición de una nueva estructura como la extremidad abrió un nuevo abanico de posibilidades de locomoción y alimentación que sin duda favorecieron una tremenda diversificación (Shubin *et al.*, 1997). Las primeras estructuras que se podrían considerar precursoras de las extremidades actuales de los vertebrados fueron probablemente aletas axiales que discurrían a lo largo de la línea media (Shubin *et al.*, 1997; Freitas *et al.*, 2006). En los tiburones y lampreas actuales, las aletas mediales emplean los mismos programas genéticos que los primordios de extremidad (hay un AER, expresión asimétrica de genes *Hoxd*), pese a que su origen embriológico es distinto (somitos, en lugar de mesodermo de la placa lateral) (Freitas *et al.*, 2006). Esto sugiere que las aletas pareadas se originaron por un reclutamiento de esos mecanismos al mesodermo de la placa lateral, algo que ocurrió hace unos 440 M.a., entre los períodos Ordovícico y Silúrico. El plan corporal con dos pares de apéndices se adquirió un tiempo después de la separación entre Agnatos y Gnatostomados (Shubin *et al.*, 1997). De las dos superclases iniciales (peces óseos o cartilaginosos) de los Gnatostomados, los tetrápodos derivan de los peces óseos, u Osteictios. Dentro de éstos se distinguen las clases de Actinoptergios (peces de aletas radiadas) y Sarcoptergios (peces de aletas lobuladas). El antepasado común más reciente de los Tetrápodos vivió hace unos 340 M.a. y pertenecía a los Sarcoptergios. El más cercano era *Panderichthyes*, del período Devónico, con el que los Tetrápodos comparten gran parte de las estructuras óseas, a excepción de la parte distal de las extremidades (Wagner y Chiu, 2001). De hecho, el autopodio es considerado una sinapomorfía de los tetrápodos. Esta extremidad primitiva, sin autopodio, se dividía en dos partes principales, de preaxial a postaxial: protoptergio (al que se unen unas estructuras llamadas radiales) y metapterigio. Los Teleósteos han perdido el metapterigio, mientras que los Tetrápodos han perdido el protoptergio. La extremidad de los Tetrápodos, por tanto, deriva del metapterigio, limitando la utilidad de la comparación entre sus elementos esqueléticos y los de la aleta de los Teleósteos (Wagner y Chiu, 2001).

La formación del autopodio fue por tanto el evento clave en la evolución de los Tetrápodos, y aunque se ha estudiado bastante, ***no existe un consenso acerca de su origen***. La teoría del eje metapterigio establece que dicho eje primigenio se mantiene en los actuales Tetrápodos y discurre a lo largo del estilopodio, el elemento posterior del zeugopodio, algunos carpos/tarsos y el dedo 4. El radio, los carpos/tarsos y los dedos anteriores derivarían de los radiales preaxiales, mientras que el dedo 5 derivaría de procesos postaxiales distintos de los radiales. De este modo, todo el autopodio derivaría de elementos plesiomórficos, pre-existentes. Una variante de la teoría sugería que tal eje en realidad se doblaba a la altura de la muñeca y su contribución acababa en los carpos, de modo que los dedos serían estructuras de nueva formación (una apomorfía), al no existir radiales postaxiales de los que evolucionar (revisado en (Hall, 2007)). La teoría del arco digital (Shubin y Alberch, 1986) propone que el eje metapterigio discurre por la parte posterior del zeugopodio y la muñeca/tobillo, y que entonces se dobla hacia la región preaxial, formando diversos carpos/tarsos. La diferencia en este caso es que esa región del eje estaría invertida, de modo que los radiales quedarían en la parte postaxial, pudiendo dar lugar a los dedos. La existencia de distintas fases de expresión de los genes *Hox* parece apoyar esta teoría (resumido en (Shubin *et al.*, 1997)), ya que el hecho de que el patrón de expresión A-P de los genes *Hoxd* se invierta en la última fase (la del autopodio) se interpretó como causa molecular de la propuesta inversión de polaridad en la parte distal del eje metapterigio (Fig. I16a). Hay investigadores que argumentan que esta teoría asume que la expresión de los genes *Hoxd* equivale a la identidad de metapterigio, asunción que no podría explicar por qué los primordios de aleta de los Teleósteos (que no derivan del metapterigio) expresan los genes *Hoxd* (Wagner y Chiu, 2001). Estos mismos investigadores proponen la alternativa del autopodio neomórfico. Según esta teoría, el autopodio tiene un

conjunto de estructuras que no pudo haber derivado de las estructuras preexistentes, y proponen que la regulación de los genes *Hox* es el evento fundamental. El primer paso en la evolución del autopodio sería la generación de un campo autopodial, definido por la expresión exclusiva de *Hoxa13*, no solapante con la de *Hoxa11*. A este respecto es destacable que en Teleósteos se expresan *Hoxa11* y *Hoxa13* en el primordio de aleta, pero siempre solapando. El siguiente paso sería la especificación de los dedos, probablemente debido a la interacción entre *Shh* y *Gli3*, con la probable participación de los genes *Hoxd* en el control de su número. Por último, concomitantemente al desarrollo de los dedos o después, surgirían los mecanismos responsables de su identidad, donde participarían, entre otros, los genes *Hoxd* (Fig. 116b).

Además de la presencia o ausencia de autopodio, hay otras diferencias importantes entre las extremidades de los Teleósteos y las de los Tetrápodos. Una de estas diferencias es el destino del AER. Mientras que en los Tetrápodos esta estructura acaba degenerando y no contribuye a ningún tejido de la extremidad, en los peces acaba formando un pliegue de tejido (*fin fold*) que se elonga, y al que migran células mesenquimales. El pliegue se mantiene estirado gracias a dos filas de fibrillas no mineralizadas llamadas actinotriquia. Recientemente se han descubierto dos proteínas muy relacionadas (actinodin1 y 2) que junto con el colágeno son un importante componente estructural de los actinotriquia (Zhang *et al.*, 2010a). Los genes de estas proteínas (*and1* y *and2*) están presentes en Teleósteos y en Elasmobranchios, pero no en Tetrápodos, lo que sugiere que eran una característica ancestral que se perdió en el linaje de los Tetrápodos. La falta de función de *and1* y *2* provoca la ausencia de los actinotriquia y la desorganización del *fin fold*, dando lugar a aletas truncadas. A nivel molecular, se produce una expansión anterior de la expresión de *Shh* y *Hoxd13*, junto con una disminución de la expresión de *Gli3* (Zhang *et al.*, 2010a). Los autores proponen que esta expresión génica, junto con la recuperación de un AER funcional que rescatara el crecimiento, daría lugar a la producción de extremidades polidáctilas. De hecho, los fósiles de los primeros Tetrápodos tienen más de cinco dedos en las extremidades (8 en *Acanthostega*, 7 en *Ichthyostega* y 6 en *Tulerperton*), por lo que es concebible que la pérdida de los genes *and1* y *and2* fuera un importante paso en la transición hacia esta superclase.



**Figura 116.** Hipótesis sobre el origen del autopodio. **a**, Teoría del arco digital (adaptado de (Shubin *et al.*, 1997)). El eje metapterigio aparece en gris (arriba) y atravesado por una línea roja (abajo). **b**, Teoría del autopodio neomórfico, dividida en tres fases (ver texto principal). Adaptado de (Hall, 2007). Nótese que los primeros tetrápodos eran polidáctilos: *Acanthostega* (8 dedos), *Ichthyostega* (7, no mostrado) y *Tulerperton* (6).

## I. INTRODUCCIÓN

Es destacable que recientemente se ha descrito que los Teleósteos también poseen la última fase de expresión de los genes *Hox*, que correlaciona con la formación de la estructura más distal de la aleta (*fin blade*), lo que llevó a los autores a proponer que esta estructura es comparable al autopodio de los tetrápodos (Ahn y Ho, 2008). No obstante, el hecho de que la expresión de *Hoxa11* y *Hoxa13* no llegue a separarse nunca en este grupo es un fuerte argumento que usan otros autores en contra de esa proposición.

### I.2.6.2 Desarrollo de la extremidad en *Drosophila* y otros artrópodos. Homología profunda.

Es evidente que las extremidades de los vertebrados y los apéndices de los artrópodos no son estructuras homólogas en el sentido clásico (el origen embrionario es distinto), pero también es cierto que comparten muchas interacciones genéticas, lo que ha llevado a proponer que ambas estructuras utilizan un mecanismo genético ancestral que tuvo que existir desde el antecesor de los bilaterales. A continuación se presenta un resumen del desarrollo de los apéndices en *Drosophila*, que si bien es un caso particular dentro de los insectos, es el más estudiado y conocido, además de que los mecanismos genéticos que emplea parecen estar presentes en otros artrópodos.

*Drosophila melanogaster* es un insecto holometábolo que atraviesa varias etapas de desarrollo. Durante la etapa embrionaria se definen los ejes A-P y D-V del cuerpo, así como la división en segmentos y la posición de algunas estructuras importantes. Durante la etapa larvaria se forman en regiones concretas unos sacos de cutícula, llamados discos imaginales, que son los precursores de los futuros “apéndices” de la mosca: antena, boca, ala, halterio, patas y *analía*. El disco de pata y el de ala difieren algo en sus mecanismos de formación de patrón, siendo con el de pata con el que más similitudes se pueden encontrar al comparar con el desarrollo de la extremidad en vertebrados. El estadio de pupa precede a la forma adulta, y conlleva una profunda reorganización de los tejidos que se han formado anteriormente.

Desde la etapa embrionaria, el futuro disco imaginal de ala y pata está dividido en dos territorios, dos linajes celulares separados, debido a la expresión de *engrailed* (*en*) en la región posterior (Fig. I17a). *en* es un gen selector, que confiere unas propiedades de adhesión particulares a las células del compartimento posterior, haciéndolas inmiscibles con las del anterior, lo que ayuda a mantener el borde de compartimento (revisado en (Morata, 2001)). También desde esa etapa, el disco de pata está polarizado en una región proximal y otra distal, definidas por la expresión de los genes *homeobox homothorax/extradenticle* (*hth/exd*) y *Distal-less* (*Dll*), respectivamente (Fig. I17a y c). Inicialmente, *hth/exd* se expresan en todo el tórax, pero la expresión de *Dll* en regiones concretas (inducida a su vez por *Wg*, *Dpp* y *Spitz*, e inhibida por los genes *Hox* del complejo *Bithorax*), tiene como consecuencia la inhibición de *hth/exd* en dichas regiones, que es donde se formarán los discos de pata. Por el contrario, *hth/exd* se expresan en todo el futuro disco de ala y de halterio en esta etapa, que además se particularizan por la expresión de *vestigial* (*vg*) (revisado en (Couso y Bishop, 1998; Morata, 2001)). Engrailed (*En*) activa *hedgehog* (*hh*) en el compartimento posterior del disco, pero *Hh* no tiene efecto allí, ya que su señalización es bloqueada por *En*. No obstante, difunde hasta el compartimento anterior, donde activa *wingless* (*wg*) en la región ventral, y *decapentaplegic* (*dpp*) en la dorsal (Fig. I17b).

Respecto a la polarización P-D, es destacable que en realidad *exd* (cuyos homólogos en vertebrados son los genes *Pbx*) se transcribe en todo el embrión, pero *Exd* sólo entra al núcleo si está *Hth* (homólogo de los factores MEIS). A su vez, la ausencia de actividad *Exd* provoca la degradación de *Hth*, de modo que estos dos factores actúan como una unidad funcional. Otros genes importantes en la región proximal son *escargot* (*esg*) y *teashirt* (*tsh*), que codifican factores de transcripción con dedo de zinc (Couso y Bishop, 1998; Morata, 2001).



El tronco y los apéndices no están formados por dos linajes celulares distintos, de modo que la distinción entre uno y otro se logra mediante el antagonismo entre la función de Hh/Wg/Dpp por un lado y Hth/Exd por otro. En la etapa larvaria, el disco de pata está subdividido en dos tipos de regiones: independiente de Hh (expresa *hth/exd*) y dependiente de Hh (inicialmente definida por la expresión de *Dll*). La pérdida de función de *hh*, *wg* o *dpp* provoca que sólo se formen las parte proximales de la pata (*coxa* y *trochanter*). Por su parte, la expresión forzada de *hth/exd* provoca defectos en el desarrollo de las regiones distales (Mercader *et al.*, 1999). La función de *hth/Meis* y de *exd/Pbx* en la polarización P-D parece por tanto estar muy conservada entre insectos y vertebrados. Es destacable que la eliminación de *Dll* antes del segundo estado larvario (*instar*) da lugar a que sólo se forme el *coxa*, mientras que si se elimina en el tercer *instar*, provoca sólo la pérdida de los tarsos. Siguiendo con las similitudes entre insectos y vertebrados, en ratón la falta de función de *Dlx5* y *6* (homólogos de *Dll* expresados en el AER), provoca la ausencia de tarsos y dedos centrales, en parte mediada por una disminución de proliferación (Robledo *et al.*, 2002).

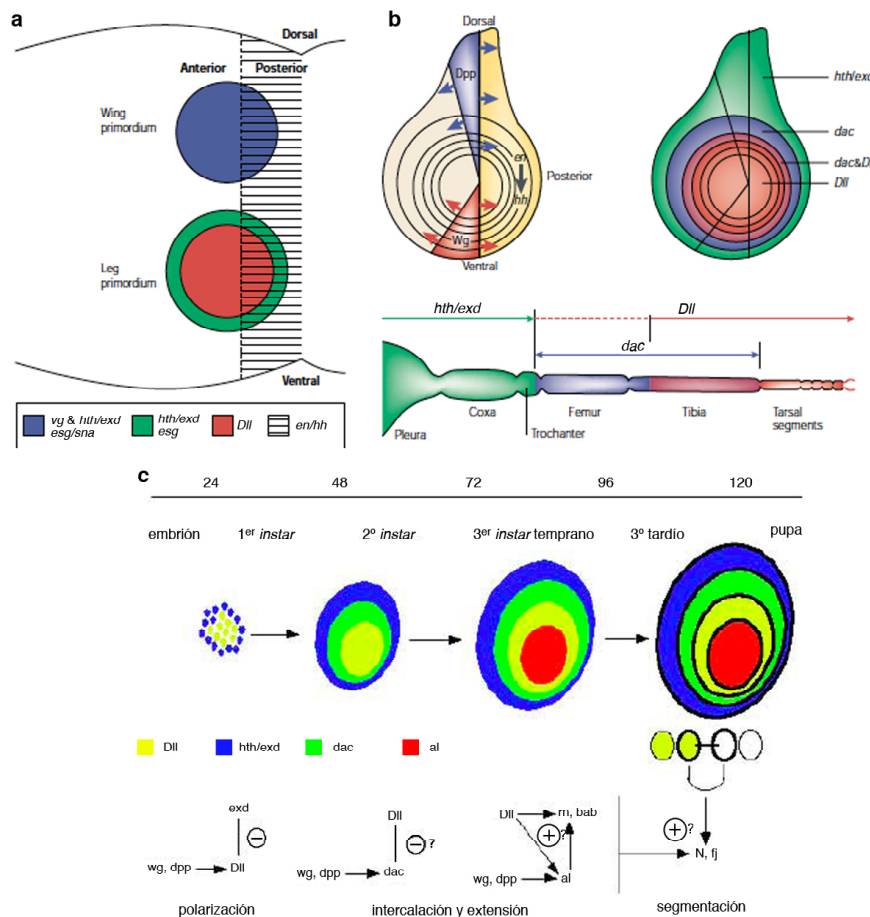
El modelo de polarización vigente establece que, por la situación de los dominios de producción de Wg y Dpp, sólo se conseguirán niveles moderados-altos de ambos en las regiones centrales del disco, donde mantienen la expresión de *Dll* y más tarde también de *dachshund* (*dac*). En las regiones periféricas del disco no se consigue la expresión de *Dll*, de modo que *hth/exd* se expresan e inhiben la señalización Hh. Más adelante se produce el refinamiento de los dominios de expresión de *Dll* (distal) y *dac* (intermedio), dando lugar a la intercalación de destinos intermedios (fémur y tibia, Fig. I17b y c). En vertebrados, los homólogos de *dac*, *Dach1* y *2*, se expresan en el mesénquima de la extremidad (positivamente regulados por FGF), y colaboran con la señalización Bmp. En pollo su función correcta se requiere para la formación de estructuras distales (expresión de *Fgf10* en el mesénquima, *Fgf8* y *Bmp7* en el ectodermo), y para inhibir la expresión de los genes *Meis* (Kida *et al.*, 2004). Curiosamente, la pérdida de *Dach1* y *Dach2* en ratón no parece provocar truncamientos en la extremidad, aunque el análisis realizado pudo ser superficial (Davis *et al.*, 2006). Ya en el tercer *instar*, *aristaless* (*al*) se expresa en el centro del disco en crecimiento, y especifica el destino más distal de la pata (Fig. I17c). *Alx4*, un homólogo de *al* en vertebrados, se expresa en el mesénquima anterodistal, y su falta de función provoca polidactilia (Qu *et al.*, 1997). A mitad del tercer *instar*, *rotund* (*rn*) y *bric-a-brac* (*bab*), se expresan alrededor de *al*, y son necesarios para la formación correcta de los tarsos 1-4 (Fig. I17c). En definitiva, esta etapa se caracteriza por una continua intercalación y expansión de destinos P-D. Finalmente, la activación de *Notch* (*N*), *Delta* (*DI*) y un poco después *four-jointed* (*fj*), en anillos concéntricos entre los dominios de expresión antes descritos, es fundamental para la segmentación, es decir, la formación de las articulaciones (Fig. I17b, revisado en (Couso y Bishop, 1998).

En los discos de ala y halterio la situación es más complicada, entre otros motivos por la generación de un dominio adicional de *wg* en el borde D/V. *apterus* (*ap*) es el gen selector encargado de promover el destino dorsal, y sólo se expresa en este compartimento. *Ap* activa *fringe* (*fng*), que modula la activación de Notch por Delta y Serrate. Notch, por su parte, activa *vg* y *wg* en el borde dorso-ventral. Esta segunda oleada de Wg, que actúa de organizador, es clave para la regulación de *vg*, que parece sustituir a *Dll* (ausente en el disco de ala) en la represión de *hth/exd* (revisado en (Morata, 2001)).

Una característica interesante es que, al igual que en vertebrados, las células del disco imaginal de ala se separan unas de otras en cultivo de acuerdo a los distintos destinos P-D (Garcia-Bellido, 1966). Además, los clones de sobreexpresión de *tsh* en regiones ectópicas activan *hth* y segregan de las células silvestres (Casares y Mann, 2000), lo que sugiere que el sistema de propiedades de adhesión también está conservado entre insectos y vertebrados.

## I. INTRODUCCIÓN

Aunque la mayoría de los artrópodos no producen discos imaginales, sino que los apéndices crecen directamente desde el cuerpo, parece ser que emplean mecanismos genéticos muy similares (revisado en (Pueyo y Couso, 2005)). En definitiva, gran parte de la red de interacciones genéticas que se emplean en el desarrollo de los apéndices están conservadas entre artrópodos y vertebrados, lo que sugiere que estos mecanismos ya existían en el antecesor común *Urbilateria* (Pueyo y Couso, 2005). Esto es lo que se conoce como homología profunda. Obviamente no hay manera de saber si dicho antecesor contaba con apéndices, pero la conservación del sistema *Meis/hth* vs *Dlx/Dll* para distinguir entre tronco vs no tronco, y la implicación de *Dach/dac* en la generación de dominios intermedios, sí que sugieren fuertemente esa posibilidad. No obstante, hay que remarcar que también se ha propuesto que los circuitos genéticos compartidos pueden a veces entenderse mejor como paralelismos o convergencias, más que homología (Swalla y Xavier-Neto, 2008). Tal vez una de las claves para resolver este problema podría estar en **estudiar la función de los retinoides en la generación de los apéndices de artrópodos**. Si la señalización por retinoides, que ahora se propone que podría haber estado presente en el antecesor de los bilaterales, juega papeles similares en la formación de patrón P-D tanto en artrópodos como en vertebrados, sería un fuerte argumento a favor de la homología profunda (ver Discusión).



**Figura I17.** Desarrollo P-D en el disco de pata de *Drosophila*. **a**, Etapa embrionaria. Modificado de (Morata, 2001). **b**, Modelo de polarización basado en la regionalización de Dpp y Wg. Modificado de (Morata, 2001). **c**, Resumen de las tres etapas principales (ver texto principal). Modificado de (Couso y Bishop, 1998).

## **II. OBJETIVOS**





El problema biológico que se ha abordado en esta tesis es el de cómo tiene lugar la formación de patrón en una estructura que está en constante crecimiento. Así, el objetivo general de este trabajo ha sido explorar algunas de las principales cuestiones pendientes en la formación de patrón proximo-distal (P-D) de la extremidad de vertebrados. Concretamente, se establecieron los siguientes objetivos específicos, englobados en tres temas generales:

### II.1 Mapas de destino tetradimensionales en la extremidad.

- a) Determinación del historial de expresión de *Meis1*, *Hoxa11* y *Hoxa13* en los precursores de los distintos segmentos P-D de la extremidad.
- b) Análisis en adultos. Si estos genes se expresan en la extremidad adulta, determinar cuál es su contribución a los elementos esqueléticos.

### II.2 Mecanismos autónomos y no autónomos en la formación de patrón próximo-distal.

- a) Evaluación de la capacidad, por parte de señales difusibles endógenas (RA y FGF), para reprogramar el destino P-D de células indiferenciadas del primordio de extremidad.
- b) Análisis del grado de contribución de mecanismos autónomos y no autónomos a la expresión de marcadores P-D en la extremidad.

### II.3. Funciones celulares reguladas por *Meis2* en la extremidad.

- a) Análisis del fenotipo derivado de la sobreexpresión ectópica de *Meis2* en la extremidad, tanto aleatoriamente como en una región concreta, haciendo especial hincapié en el efecto a nivel celular.
- b) Búsqueda de genes diana de *Meis2* que puedan estar involucrados en los fenotipos descritos en el objetivo a).



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



### III.1. Materiales.

#### III.1.1 Reactivos y kits.

- 1 kb ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- 100 bp DNA ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- 4-hidroxitamoxifeno 70% pureza (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- AB complex HRP (Vector; Burlingame, CA, USA)
- Absolutely RNA miniprep kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA)
- Acetato sódico (Merck, Darmstadt, Germany)
- Ácido clorhídrico (Merck, Darmstadt, Germany)
- Ácido fórmico (Merck, Darmstadt, Germany)
- Ácido maleico (Sigma-Aldrich Corp; St. Louis, MO, USA)
- Ácido tricloroacético (Merck, Darmstadt, Germany)
- Agarosa (Bio- Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- Alcian Blue (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Alcian Green (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Alizarin Red (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Ampicilina (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Anhídrido acético (Merck, Darmstadt, Germany)
- Aquatex mounting media (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Beta-mercapto etanol (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Blocking Reagent (Roche, Mannheim, Germany)
- BM purple (Roche, Mannheim, Germany)
- Bromuro de etidio (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- BSA (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Chaps (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Cloruro de magnesio (Merck, Darmstadt, Germany)
- Cloruro de potasio (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Cloruro de sodio (Merck, Darmstadt, Germany)
- DAB peroxidase substrate (Vector; Burlingame, CA, USA)
- D-glucosa (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Dihidrogenofosfato de potasio (Riedel de Haën, Seelze, Germany)
- Dil (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)
- Dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- DiO (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)
- Ditiotritol (Promega, Madison, WI, USA)
- DMEM (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- DPX mountant for histology (Fluka, Buchs, Switzerland)
- EDTA (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- etanol 95% (Merck, Darmstadt, Germany)
- etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Germany)
- Extracto de levadura (Gibco BRL Life-Technologies GmbH, Eggenstein, Germany)
- Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Ferrocianato potásico (Merck, Darmstadt, Germany)
- Ferrocianuro potásico (Merck, Darmstadt, Germany)
- Formaldehído 36% (Merck, Darmstadt, Germany)
- Formamida (Panreac Química, Barcelona, España)
- Ganciclovir (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Gelatina de piel porcina (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Glicerol (Merck, Darmstadt, Germany)
- Glucógeno (Roche, Mannheim, Germany)
- Glutaraldehído (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Heparina (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Hidrogenofosfato de sodio (Riedel de Haën, Seelze, Germany)
- Hidróxido de potasio (Merck, Darmstadt, Germany)
- Hidróxido de sodio (Merck, Darmstadt, Germany)
- Isopropanol (Merck, Darmstadt, Germany)

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

---

- Kanamicina (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Lambda BstE II digest (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- Levamisol (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- LIF (ESGRO-Millipore, Billerica, MA, USA)
- Lipofectamina + PLUS reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Medio de células ES (Gibco BRL Life-Technologies GmbH, Eggenstein, Germany)
- Megaprime DNA labeling system (Amersham Biosciences, GE Healthcare group)
- Membrana de Nitrocelulosa (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA)
- Metil salicilato (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Micro Bio-Spin Chromatography Columns (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- Microesferas acrílicas heparinizadas (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Microesferas AG1-X2, 150-200 µm de diámetro (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- Mitomicina C (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Neomicina G-418 (Euroclone Life Sciences Division, Pero, Italy)
- Para-Formaldehído (Merck; Darmstadt, Germany)
- Parafina (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- PCR nucleotide mix (Roche, Mannheim, Germany)
- Penicilina + Estreptomina (Cambrex Bioscience, Velviers, Belgium)
- Plasmid maxi kit (Quiagen GmbH, Hilden, Germany)
- Qiaquick gel extraction kit (Quiagen GmbH, Hilden, Germany)
- RNA DIG-Labeling kit (Roche, Mannheim, Germany)
- RNA FLU-Labeling kit (Roche, Mannheim, Germany)
- RNAeasy mini kit (Quiagen GmbH, Hilden, Germany)
- RNasin, RNase inhibitor (Promega, Madison, WI, USA)
- Rojo fenol (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Sacarosa (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Suero de caballo (Gibco BRL Life-Technologies GmbH, Eggenstein, Germany)
- Suero de cabra (Gibco BRL Life-Technologies GmbH, Eggenstein, Germany)
- Suero fetal bovino (Euroclone Life Sciences Division, Pero, Italy)
- Trietanol amina (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Triptona (Gibco BRL Life-Technologies GmbH, Eggenstein, Germany)
- Tris base (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Tritón X-100 (Calbiochem; Darmstadt, Germany)
- Triton X-100 (Roche, Mannheim, Germany)
- tRNA (Sigma-Aldrich Corp; St. Louis, MO, USA)
- Tween 20 (Merck, Darmstadt, Germany)
- Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- Vectastain ABC peroxidase kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- Victoria Blue (Sigma-Aldrich Corp; Saint Louis, MO, USA)
- Wizard Plus SV Minipreps (Promega, Madison, WI, USA)
- X-Gal (Venn Nova, Pompano Beach, FL, USA)
- Xilol (Merck; Darmstadt, Germany)

#### III.1.2 Retinoides, factores de crecimiento e inhibidores químicos.

- [1S, 2S]-N-[4-[2-(dimetilamino)-1-(1H-imidazol-1-il) propil]-fenil]-2-benzotiazolamina (R116010); encargado sintetizar a la compañía InnoChemie GmbH (Würzburg, Germany)
- 3-[3-(2-Carboxyethyl)-4-methylpyrrol-2-methylidenil]-2-indolinona (SU5402; Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Ácido (E)-4-[2-[5,6-Dihidro-5,5-dimetil-8-(2-feniletinil)naftalen-2-il]eten-1-il] benzoico (BMS 493); encargado sintetizar a la compañía InnoChemie GmbH (Würzburg, Germany)
- Ácido retinoico (Sigma-Aldrich Corp; St. Louis, MO, USA)
- Recombinant human FGF4 (R&D systems)
- Recombinant murine FGF8b (R&D systems)

#### III.1.3 Enzimas.

- Cell death detection kit (Roche, Mannheim, Germany)

- DNA polimerasa I, fragmento Klenow (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- DNAsa (Roche, Mannheim, Germany)
- DNAsa I (Roche, Mannheim, Germany)
- Enzimas de restricción: Roche (Apa I, Sma I, Bsp I), Fermentas (FspA I) y New England Biolabs (resto)
- Expand High Fidelity PCR system (Roche, Mannheim, Germany)
- Expand Long Template PCR system (Roche, Mannheim, Germany)
- Master Mix Taq polymerase (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Proteínasa K (Roche, Mannheim, Germany)
- SP6 RNA polimerasa (Promega, Madison, WI, USA)
- Superscript Reverse Transcriptase RNaseH-free (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, USA)
- T3 RNA polimerasa (Roche, Mannheim, Germany)
- T4 DNA ligasa (Promega, Madison, WI, USA)
- T7 RNA polimerasa (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- Taq DNA polimerasa (Roche, Mannheim, Germany)
- Tripsina (Gibco BRL Life-Technologies GmbH, Eggenstein, Germany)

#### III.1.4 Anticuerpos.

##### a) Primarios

- Mouse anti-beta galactosidasa 40-1a (Hybridoma Bank)
- Rabbit anti-fosfohistona 3 policlona (Millipore, Billerica, MA, USA)
- Rabbit anti-GFP policlona (Living Colors, Mountain View, CA, USA)
- Rabbit anti-caspasa3 activada (Cell Signaling Technology)
- Goat anti-ITGA9 (R&D systems)
- Rat anti-CD68 (AbD Serotec)
- Rat anti-MAC3 (BD Pharmingen)
- Goat anti-CD206 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)

##### b) Secundarios/Amplificación

- AP-conjugated sheep anti-Digoxigenin, Fab fragments (Roche, Mannheim, Germany)
- AP-conjugated sheep anti-Fluorescein, Fab fragments (Roche, Mannheim, Germany)
- Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)
- Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)
- Alexa Fluor 633-conjugated goat anti rat (Invitrogen)
- Cy3-conjugated donkey anti goat (Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA, USA)
- Biotin-SP-conjugated goat anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA, USA)
- Biotin-SP-conjugated donkey anti-goat (Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA, USA)
- Dylight 594-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA, USA)
- Cy3-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA, USA)
- Cy5-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA, USA)

#### III.1.5 Plásmidos.

- FRT-PGK-gb2-neo-FRT-loxP template (Gene Bridges GmbH, Dresden, Germany)
- pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA, USA)
- pCAGGS/SE ((Stuhmer *et al.*, 2002))
- pCR Blunt (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- pGEMT Easy (Promega, Madison, WI, USA)
- pZ/EG ((Novak *et al.*, 2000))
- Clones de cDNA:
  - RIKEN 1700001E04 (IMAGE: 30916569)
  - Hddc3 (IMAGE: 5119020)
  - Pcdh8 (IMAGE: 5718846)
  - Crebzf (IMAGE: 5255639)
  - Pick1 (IMAGE: 6488048)
  - Brd8 (IMAGE: 5323755)
  - Zfr (IMAGE: 4952157)
  - Itga9 (IMAGE: 5371378)
  - Rab6b (IMAGE: 64061634)
  - Col4a6 (IMAGE: 3500535)
  - Depdc6 (IMAGE: 3257322 5- y 3-)



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

---

- Sondas prestadas: cCyp26b1 (Malcom Maden), cHoxa11 (Marian Ros), cAP2 (Cliff Tabin), cCyp1B1 y mCyp1B1 (Andrew Lumsden), cSprouty2 (Kate Storey), mPcdh8 (Helen Makarenkova), cShox, cShox2 y mShox2 (G. Rappold), mTcfap2e (Trevor Williams), mPdlm3 (Charles Stiles) y cRAR $\beta$  (Ruth Díez del Corral)

#### III.1.6 Equipamiento.

- Cámara DXM1200 F (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA)
- Cámara DXM1200C (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA)
- Criostato motorizado CM1950 (Leica, Cambridge, UK)
- Electroporador celular “Micropulser” (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA)
- Horno de hibridación (Amersham Life Science, Little Chalfont, Bucks UK)
- Lupa binocular SMZ-1000 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA)
- Lupa MZFL III (Leica, Cambridge, UK)
- Microinyector presurizado (Injectmatic, Genève, Switzerland)
- Microscopio confocal Nikon A1R (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA)
- Microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA)
- Microtomo semi-automático (Leica, Cambridge, UK)
- Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Products, Wilmington, DE, USA)
- Ocular de lupa con retícula micrométrica (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA)
- Termociclador PTC-200 (MJ Research Inc., Waltham, MA)
- Termociclador C1000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA)
- Termociclador PCYL 220 (Thermo Fisher Scientific Incorporation)
- Tijeras, pinzas y microbisturí (Fine Science Tools, Foster City, CA, USA)
- Robot InSitu Pro VS (Intavis Bioanalytical Instruments, Koeln, Germany)

#### III.1.7 Modelos animales.

- Huevos fertilizados de pollo, cepa Rhode Island (Granja Gibert, Tarragona, España)
- Ratones cepa C57BL6 (Harlan, Indianápolis, Indiana, USA)
- Ratones cepa CD1 (Harlan, Indianápolis, Indiana, USA)
- Ratones Meis1<sup>CFP/+</sup> (Miguel Torres y Giovanna Giovino)
- Ratones R26R (Soriano, 1999) y R26R-EYFP (Srinivas *et al.*, 2001)
- Ratones R26RMeis2a-IRES-EYFP (Carlos G. Arques, Giovanna Giovino y Miguel Torres)
- Ratones Shh<sup>GfpCre/+</sup> (Harfe *et al.*, 2004)

#### III.1.8 Software científico/de imagen.

- Cell Profiler (Broad Institute Imaging Platform; Cambridge, MA, USA)
- Image J
- Adobe PhotoShop y Adobe Illustrator (Adobe Systems; San Jose, CA, USA).
- NIS elements (Nikon Instruments Inc.; Melville, NY, USA)
- LAS AF (Leica, Cambridge, UK)

### III.2. Métodos.

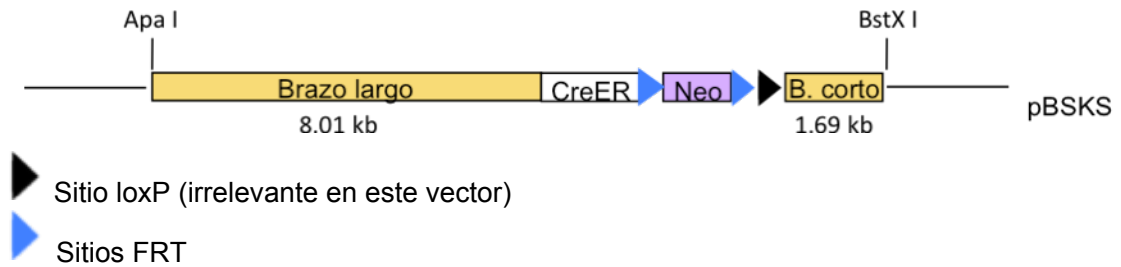
#### III.2.1 Generación de ratones *Knock-In*.

##### III.2.1.1 Construcción de los vectores de *targeting*.

*Meis1*. Se construyó inicialmente un vector compuesto por un brazo de homología de 8.01 Kb (de -8010 a +3 respecto del ATG donde comienza el marco de lectura), seguido, en fase con dicho ATG, por la secuencia codificante de *CreER*<sup>T2</sup>, y después el gen de resistencia a

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

Neomicina flanqueado por sitios FRT. A continuación el otro brazo de homología, de 1.69 Kb (de +63 a +1748), seguido del gen de selección negativa que codifica la toxina diftérica (DTA) (Soriano, 1997). El “esqueleto” del vector es un pBluescript KS II. Todos los marcos de lectura están en la misma orientación. De esta manera, de producirse la recombinación homóloga, se eliminarían los 6 últimos nucleótidos del exón 1 y 54 nucleótidos del intrón 1 del locus *Meis1*. Esta eliminación, junto con la inserción de las secuencias codificantes de interés, convierten el alelo en nulo, según se comprobó anteriormente en nuestro laboratorio para una modificación muy similar del mismo locus (*Knock-In* de CFP en *Meis1*, realizado por Giovanna Giovinazzo). Finalmente, tras varias pruebas infructuosas, se decidió eliminar el gen de selección negativa, ya que esta estrategia había resultado exitosa en la generación de la mencionada línea *Meis1*-CFP. Así pues, la estructura definitiva del vector quedó así:



Oligonucleótidos y condiciones de PCR utilizadas para amplificar los brazos de homología:

Brazo largo:

G7/02\_Fwd: 5' CTCGAGAATAATCATTCCCCACTACCA 3' (sitio Xho I en rojo)

G8/02\_Rev: 5' GTCGACGGCCTCTCTGGCTCCCTT 3' (sitio Sal I en rojo)

DNA	~ 300-500ng	<b>Ciclos:</b>	2' - 94°C
10x Buffer 3	5 µl	7x	20"- 94°C
Fwd	1.5 µl		30"- 60°C
Rev	1.5 µl		6' - 68°C
10 mM dNTP	2.5 µl	25x	15"- 94°C
Expand Long Templ.	0.75 µl		30"- 65°C
H <sub>2</sub> O hasta	50 µl		6' - 68°C
			10' - 68°C

Brazo corto:

G9/02\_Fwd: 5' TGGCTGAAAGACACTGCTACTAAG 3'

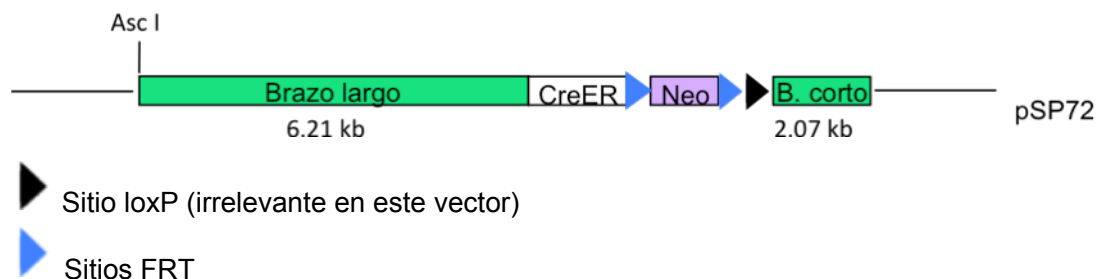
G11/02\_Rev: 5' TAAAGTTGAGCGTTCTGTTGTAA 3'

DNA	~ 300-500ng	<b>Ciclos:</b>	2' - 94°C
10x Buffer	10 µl	30x	20"- 94°C
Fwd	3 µl		30"- 54°C
Rev	3 µl		1'45"- 72°C
10 mM dNTP	2 µl		
25mM MgCl <sub>2</sub>	6 µl		7' - 72°C
Expand High Fidelity	0.75 µl		
H <sub>2</sub> O hasta	100 µl		

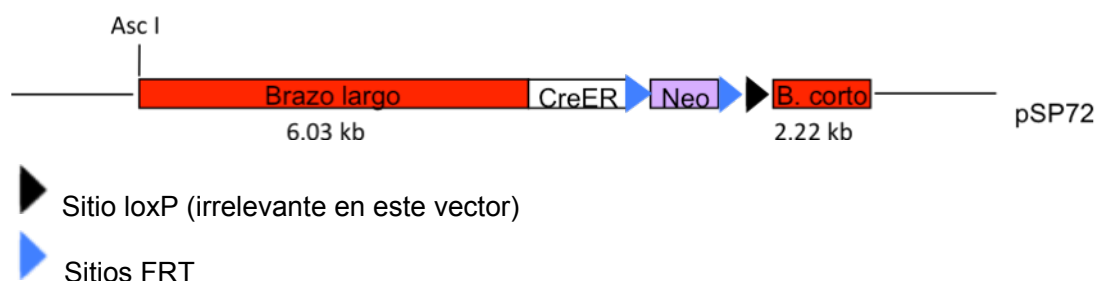
*Hoxa11*. El vector de *targeting* que se construyó inicialmente no llegó a funcionar, así que finalmente se acabó encargando su construcción a la compañía ITL (Ingenius Targeting Laboratory). La secuencia que se utilizó para diseñar la estrategia fue OTTMUST00000045416. A partir de un clon BAC positivo para *Hoxa11* de una librería C57BL6 (RPCI23:33N14), una

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

región de ~10.63 kb fue subclonada en el plásmido pSP72 (Promega) mediante una técnica basada en recombinación homóloga en bacterias (Copeland *et al.*, 2001; Testa *et al.*, 2003). El *cassette* CreER<sup>T2</sup> FRT-Neo-FRT-LoxP se insertó en el exón 1, en fase con el ATG endógeno, reemplazando 2357 pb (que incluyen toda la región codificante de los exones 1 y 2). Así pues, de producirse la recombinación homóloga, el alelo se convertiría en nulo. Ésta es la estructura esquematizada:



*Hoxa13*. Al igual que en el caso anterior, el vector inicial no funcionó en nuestras manos (se probó con y sin selección negativa), por lo que se acabó encargando a la compañía ITL. La secuencia que se utilizó para diseñar la estrategia fue ENSMUST00000114416. Curiosamente dicha secuencia de Ensembl no coincide exactamente con la secuencia que aparece en otras bases de datos (refGene\_NM\_008264), porque en la primera se distinguen tres exones y en la última dos. No obstante, ambas coinciden en la secuencia de la región genómica que se quería modificar, por lo que dicha circunstancia no afectó al diseño de la estrategia. A partir de un clon BAC positivo para *Hoxa13* de una librería C57BL6 (RPCI23:33N14), una región de ~10.12 kb fue subclonada en el plásmido pSP72 mediante recombinación homóloga. El *cassette* CreER<sup>T2</sup> FRT-Neo-FRT-LoxP se insertó en el exón 1, en fase con el ATG endógeno, reemplazando 1864 pb (que incluyen el resto de la región codificante). Así pues, de producirse la recombinación homóloga, el alelo se convertiría en nulo. Ésta es la estructura esquematizada:



**Nota:** los brazos de homología de los tres vectores originales no fueron clonados por el doctorando, sino por Giovanna Giovinazzo, actualmente en la unidad de *Gene Targeting* del CNIC.

#### III.2.1.2 Comprobación de la actividad de la versión quimérica de CreER<sup>T2</sup>.

A partir del vector de *targeting* de *Meis1*, se amplificó por PCR y luego se subclonó en el vector de expresión pCAGGS/SE la nueva versión de CreER<sup>T2</sup> resultante de su fusión con los primeros nucleótidos del marco de lectura de *Meis1* y con parte del sitio de clonaje múltiple del vector *Bluescript*. 400 ng de esta construcción se cotransfectaron mediante lipofectamina (protocolo del fabricante) junto con 200 ng del vector pZ/EG (que expresa GFP cuando hay actividad Cre; obtenido de Corrine G. Lobe) en células 293T, y se cultivaron con DMEM en placas de 12 pocillos con o sin 4-hidroxitamoxifeno (300 nM). A las 40 horas se fotografiaron con un microscopio invertido de fluorescencia.

Oligonucleótidos utilizados para amplificar la versión quimérica:

CreM1Inf-U: 5' GAAGTAGGAAGGGAGCCAGA 3'

CreM1Inf-L: 5' CCGCCCTTTAGTGAGGGTTA 3'

Programa de PCR: 95°C 2'30"; 28x(95°C 30", 60°C 45", 68°C 2'30"); 68°C 10'; 4°C indef.

Se usó la polimerasa Expand Long Template de Roche, con ~200 ng de DNA.

#### III.2.1.3 Electroporación de células ES

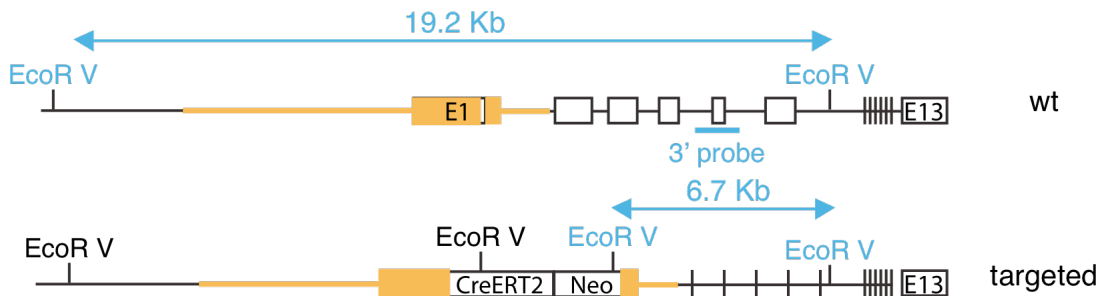
Entre 25 y 30 microgramos del vector de *targeting* de *Meis1* fueron digeridos con Apa I y BstX I para separar la construcción de interés del esqueleto del pBS. Tras cortar la banda de interés en un gel de agarosa al 0.8%, el DNA se recuperó por electroelución y se fenolizó para purificarlo (Maniatis *et al.*, 1982). Posteriormente el DNA se usó para electroporar 10 millones de células ES (electroporador Micropulser, 250 V, 500  $\mu$ F), siguiendo los protocolos establecidos (Torres, 1998)

**Nota:** Si bien el doctorando realizó todos los pasos de este proceso en varias ocasiones, la electroporación exitosa del vector de *Meis1* fue llevada a cabo, tras varios intentos, por el servicio de *Gene Targeting* del CNIC. En cuanto a los vectores de *Hoxa11* y *Hoxa13*, la electroporación la llevó a cabo la compañía ITL.

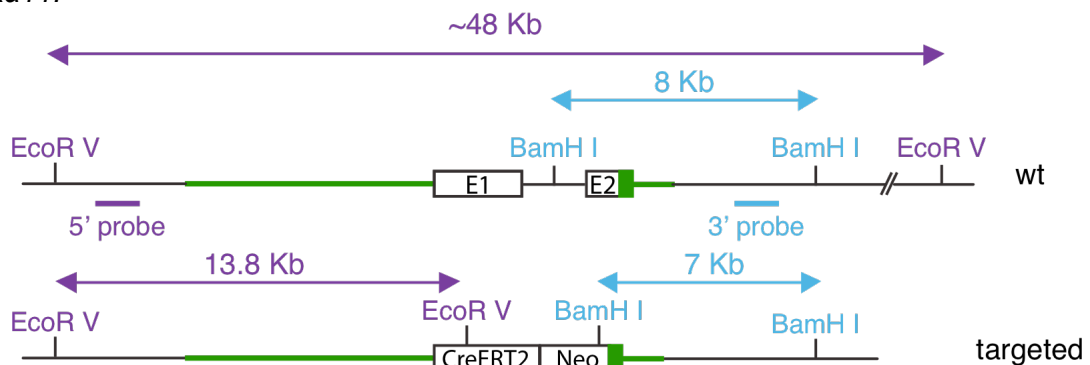
#### III.2.1.4 Selección y verificación de colonias.

Tras la selección positiva con el antibiótico Neomicina (G-418) se picaron las colonias supervivientes, se expandieron por duplicado, se extrajo su DNA (protocolo detallado en (Torres, 1998), se digirió con la enzima de restricción adecuada y se ensayó por Southern Blot (Southern, 1975) para buscar aquellos clones en los que había ocurrido la recombinación homóloga. Las estrategias de verificación fueron las siguientes:

##### *Meis1*:

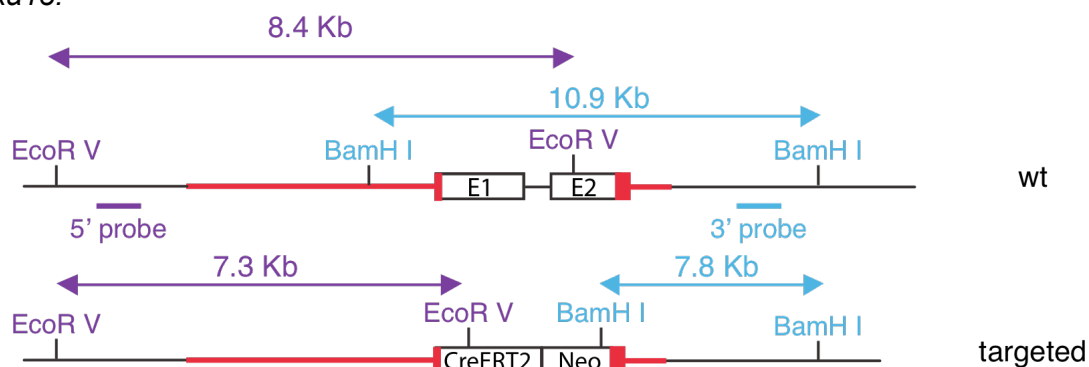


##### *Hoxa11*:



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

*Hoxa13*:

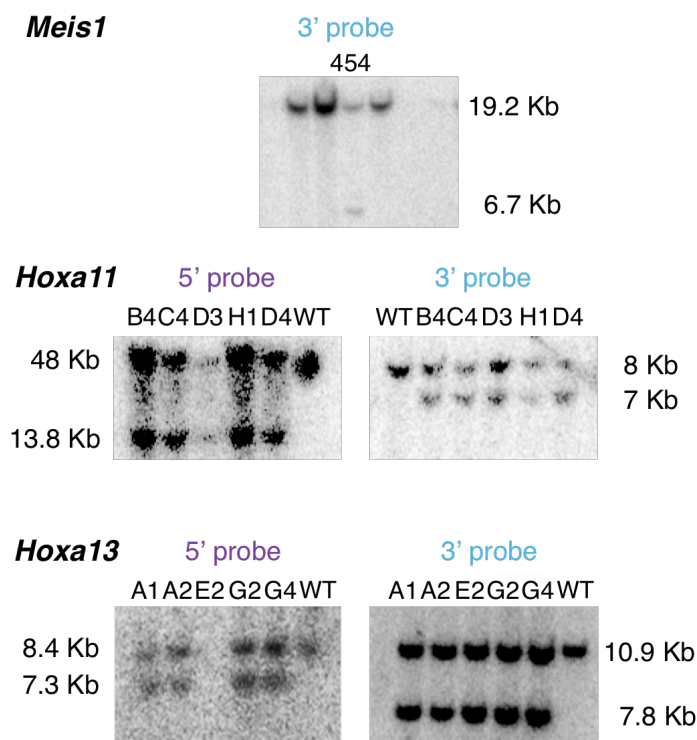


De entre todos los clones analizados, 1 de *Meis1*, 14 de *Hoxa11* y 26 de *Hoxa13* fueron identificados como positivos.

**Nota:** La selección y verificación exitosa fue llevada a cabo, tras varios intentos, por el servicio de *Gene Targeting* del CNIC (aunque el cultivo, selección y extracción de DNA de las células ES electroporadas con los vectores de *Hoxa11* y *Hoxa13* fueron realizados por la compañía ITL).

#### III.2.1.5 Generación de quimeras.

Los clones de células ES modificadas se reexpandieron, se verificaron de nuevo (Fig. M1) y se agregaron a mórulas o se inyectaron en blastocistos silvestres de la cepa C57BL6. Dichos agregados se implantaron en una madre pseudogestante para obtener individuos quiméricos (Nagy, 2003).



**Figura M1.** Filtros de confirmación de varios clones positivos para cada línea, según se indica.

Las células ES utilizadas en el caso del vector de *Meis1* pertenecían a la cepa 129R1; mientras que en los otros dos casos, eran células híbridas C57BL/6NTac x 129S6/SvEvTac (Taconic).

En ambos casos el color del pelaje derivado de la presencia de las células modificadas era agutí, mientras que las células silvestres daban lugar a pelaje negro. Por tanto, el grado de quimerismo se estableció sencillamente evaluando el porcentaje de pelaje de color agutí presente en las crías quiméricas (Fig. M2). Debido al origen masculino de las células ES utilizadas, sólo los individuos quiméricos machos resultaban útiles *a priori* para transmitir dicha modificación. Así pues, si las células ES modificadas contribuían a la línea germinal de dichas quimeras, éstas podían transmitir la modificación a su descendencia (F1) e iniciar la línea modificada genéticamente. En el caso de la F1 de la línea *Meis1<sup>CreERT2/+</sup>*, sólo los individuos agutíes podían provenir de las células modificadas, mientras que en los otros dos casos, dada la naturaleza híbrida de las células ES utilizadas, tanto los individuos negros como los agutíes podían presentar la modificación.



**Figura M2.** Fundadores de la línea *Meis1<sup>CreERT2/+</sup>* exhibiendo diversos grados de quimerismo.

La eliminación del gen de selección positiva (necesaria para evitar que su fuerte promotor afecte a la expresión de genes vecinos) se realizó, en todos los casos, cruzando los ratones obtenidos con una línea transgénica que expresa la recombinasa Flpe de manera ubicua (Rodríguez *et al.*, 2000). Los descendientes de este cruce ya no portaban el gen de resistencia. En sucesivas generaciones, el transgén para la recombinasa se eliminó mediante cruces con ratones que no portaban dicho transgén. La presencia del gen de resistencia a Neomicina así como la del gen Flpe se detectó mediante PCRs específicas (Tabla I)

Oligo Flpe Sense	5' CTAATGTTGTGGGAAATTGGAGC 3'
Oligo Flpe Antisense	5' CTCGAGGATAACTTGTATTATTC 3'
Programa Flpe	94°C 5'; 25x(94°C 1', 60°C 1', 72°C 1'); 72°C 10'; 4°C indef.
Oligo Neo Sense	5' AGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTG 3'
Oligo Neo Antisense	5' AAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCG 3'
Programa Neo	94°C 5'; 35x(94°C 1', 55°C 1', 72°C 1'); 72°C 10'; 4°C indef.

**Tabla I.** Oligonucleótidos y programas de PCR utilizados para detectar los transgenes Flpe y Neo

**Nota:** La expansión y verificación de los clones positivos fue llevada a cabo por el servicio de *Gene Targeting*, mientras que los siguientes pasos hasta la generación de los ratones quiméricos fueron realizados por la Unidad de Transgénesis del CNIC.



#### III.2.2 Determinación del genotipo de los ratones modificados genéticamente.

En todos los casos, la presencia del alelo modificado se detectó realizando una PCR para amplificar parte de la secuencia de la Cre, usando oligonucleótidos y condiciones descritos en la literatura para la línea ShhGFPCre (Harfe *et al.*, 2004), que también se empleó en esta tesis. En el caso de querer llevar la modificación a homocigosis, la presencia o ausencia del alelo silvestre de *Hoxa11/13* o de *Shh* se detectó mediante amplificación por PCR (con oligonucleótidos diseñados *de novo*) de la secuencia silvestre en torno al ATG endógeno (Tabla II).

Las modificaciones en el *locus* ROSA26, usado para dirigir la expresión de los genes testigo, se detectaron mediante una PCR con tres oligonucleótidos (IMR, Tabla II), capaz de generar una banda silvestre, una *Knock-out* o ambas (Soriano, 1999), según el ratón fuera silvestre, homocigoto o heterocigoto para la modificación, respectivamente. En ocasiones, hubo que genotipar mediante oligonucleótidos específicos para el gen de la beta-galactosidasa o para la GFP.

Oligo Harfe-Cre Forward	5' TGACGGTGGGAGAATGTTAAT 3'
Oligo Harfe-Cre Reverse	5' GCCGTAAATCAATCGATGAGT 3'
Oligo ShhWT Upper	5' CGAGCGAGGAAGGGAGAG 3'
Oligo ShhWT Lower	5' CCCAAAGAGCAAACAGAGCA 3'
Programa Cre	94°C 4'; 32x(94°C 30", 55°C 30", 72°C 1'); 72°C 10'; 4°C indef.
Oligo Hoxa11 U3	5' GGTGGCTACAAAGAAAGGAA 3'
Oligo Hoxa11 L4	5' AATGGCGTACTCTCTGAAGG 3'
Programa Hoxa11/GFP	94°C 4'; 35x(94°C 30", 56°C 30", 72°C 1'); 72°C 10'; 4°C indef.
Oligo Hoxa13 U5	5' AACCTGTGAGTGCTAAGG 3'
Oligo Hoxa13 L5	5' TCTCTTTGACCCTCCTGTTC 3'
Programa Hoxa13	94°C 4'; 35x(94°C 30", 51°C 30", 72°C 1'); 72°C 10'; 4°C indef.
Oligo IMR 883	5' AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT 3'
Oligo IMR 315	5' GCGAAGAGTTTGTCTCAACC 3'
Oligo IMR 316	5' GGAGCGGGAGAAATGGATATG 3'
Programa ROSA26	94°C 3'; 30x(94°C 30", 55°C 30", 72°C 1'); 72°C 5'; 4°C indef.
Oligo Harfe-GFP Fwd	5' ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG 3'
Oligo Harfe-GFP Rev	5' CGATGGGGGTGTTCTGCTGGTAGT 3'
Oligo LacZ U1	5' CTGGCGTAATAGCGAAGAGG 3'
Oligo LacZ L1	5' AAATTCAGACGGCAAACGAC 3'
Programa LacZ	94°C 4'; 32x(94°C 30", 59°C 30", 72°C 1'); 72°C 10'; 4°C indef.

**Tabla II.** Oligonucleótidos y programas de PCR utilizados para detectar los alelos indicados



## III.2.3 Manipulación del embrión de pollo.

## III.2.3.1 Transplantes de zonas de progreso a somitos, a ala proximal, a futuro zeugopodio y a cabeza.

Los huevos de pollo se incuban a 38 °C en tres tandas separadas por doce horas y se dejan crecer entre tres y cuatro días, para tener especímenes de estadios entre HH19 y 24 (Hamburger, 1951). A los huevos en posición horizontal se les abre una ventana el día anterior al de la operación, quitando algo de albúmina, para que el embrión no se pegue a la cáscara. La ventana se cierra con cello (más detalles en (Ros *et al.*, 2000)).

El día de la operación, se seleccionaron los donantes de primordios de pata de estadios entre HH19 y 24. El embrión donante se saca a una placa de Petri con PBS, se quitan las membranas que lo cubren y los primordios de pata se cortan y se trasladan a otra placa. Allí se cortan las 100 ó 200 micras más distales, inclinando el plano de corte hacia la zona posterior para compensar el sesgo posterior del mapa de destinos del primordio (Vargesson *et al.*, 1997), y así coger células de un nivel próximo-distal más homogéneo. Los primordios del donante se cortan uno a continuación del otro y se comparan en el mismo campo de visión para tratar que sean lo más parecidos posible en tamaño. Después se guardan en PBS hasta su implantación. Se abren con pinzas de relojero la membrana vitelina y la amniótica del embrión receptor, y mediante una aguja de tungsteno se hace una herida de tamaño adecuado (unas 600x200 µm), bien en el mesodermo paraxial (aproximadamente a la altura del primordio de ala) de un embrión HH20, en la zona proximal de un primordio de ala HH19-20, en el futuro zeugopodio de un primordio HH24, o en la región más anterior del romboencefalo de un embrión HH19-20 (en este último caso, la herida es longitudinal, no un rectángulo, porque se ensancha por sí misma dada la naturaleza del tejido). La herida debe tener sangrado, aunque no excesivo. A continuación la zona de progreso a transplantar se transfiere mediante una pipeta Pasteur de la placa con PBS al embrión, y con ayuda de las pinzas se coloca sobre la herida, hasta que queda en el sitio deseado. El huevo se cierra de nuevo con cello evitando moverlo, y se deja reposar 1 hora antes de comprobar la presencia del injerto y devolverlo al incubador. A partir del día siguiente y hasta el día en que se vaya a fijar, se comprueba una vez al día a través del cello si el embrión está vivo. Si no está vivo, pero ha avanzado lo suficiente como para formar elementos esqueléticos reconocibles, se procesa para tinción de cartilago (en caso de no haber crecido lo suficiente, se descarta). Si está vivo, se deja crecer hasta el estadio de interés, momento en que se extrae del huevo, se decapita, se eviscera, se despelleja (opcional, según qué tejidos interese analizar), se lava en PBS y se procesa de acuerdo al protocolo a realizar.

## III.2.3.2 Transplantes de 200 µm, con microesferas cargadas con distintas sustancias.

El proceso para realizar los transplantes es idéntico al ya descrito, pero en este caso una de las puntas distales provenientes de un mismo donante se acompaña de una(s) microesfera(s) de sefarosa cargada(s) con RA, SU5402, o una mezcla de SU5402 y BMS493, introducida(s) en la masa mesenquimal y centrada en los tres ejes (en el caso de ser una) u ocupando casi toda la extensión anteroposterior del transplante (en el caso de ser dos o tres). Las microesferas cargadas con RA se introdujeron muy superficialmente, para evitar que provocaran la muerte de la cresta ectodérmica (Tickle *et al.*, 1982; Summerbell, 1983; Tickle *et al.*, 1985), mientras que las de SU5402 se colocaron a la mayor profundidad posible dentro del injerto, porque si no se observaba que la inhibición de la señalización FGF no era completa. Los compuestos mencionados se disolvieron en DMSO, a las siguientes concentraciones: 0.1 ó 1 mg/ml (RA), 2.5 mg/ml (SU5402 o BMS493 por separado) ó 4-5 mg/ml (SU5402 y BMS493 mezclados). Las microesferas de sefarosa utilizadas se basan en el intercambio aniónico para liberar progresivamente compuestos cargados negativamente (en medios polares, el equilibrio de

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

---

disociación del RA se encuentra desplazado hacia esta forma). La mayor eficiencia de intercambio aniónico se produce cuando el material de la microesfera está unido a iones formato (coloquialmente se dice que están “formateadas”), pero las que se compran al proveedor están unidas a iones cloruro, por lo que deben acondicionarse previamente a su uso (“formatearse”), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para cargar las microesferas, se incuban en una gota de la sustancia en cuestión disuelta en DMSO a la concentración deseada durante 30 minutos – 1 hora en oscuridad, luego se transfieren a una gota de suero salino (123 mM NaCl en agua) para lavarlas, y por último, si es necesario, a una gota de DMEM (o rojo neutro al 0.03% en suero salino), para que queden coloreadas. Se guardan en oscuridad hasta que se usan.

#### III.2.3.3 Inserción de microesferas en el primordio de extremidad.

Las microesferas de intercambio aniónico se cargaron con RA, SU5402 (inhibidor de FGFR1), BMS493 (panantagonista de RARs) o R116010 (inhibidor de CYP26), con el mismo protocolo descrito en el apartado anterior. Las bolas control se incubaron con DMSO.

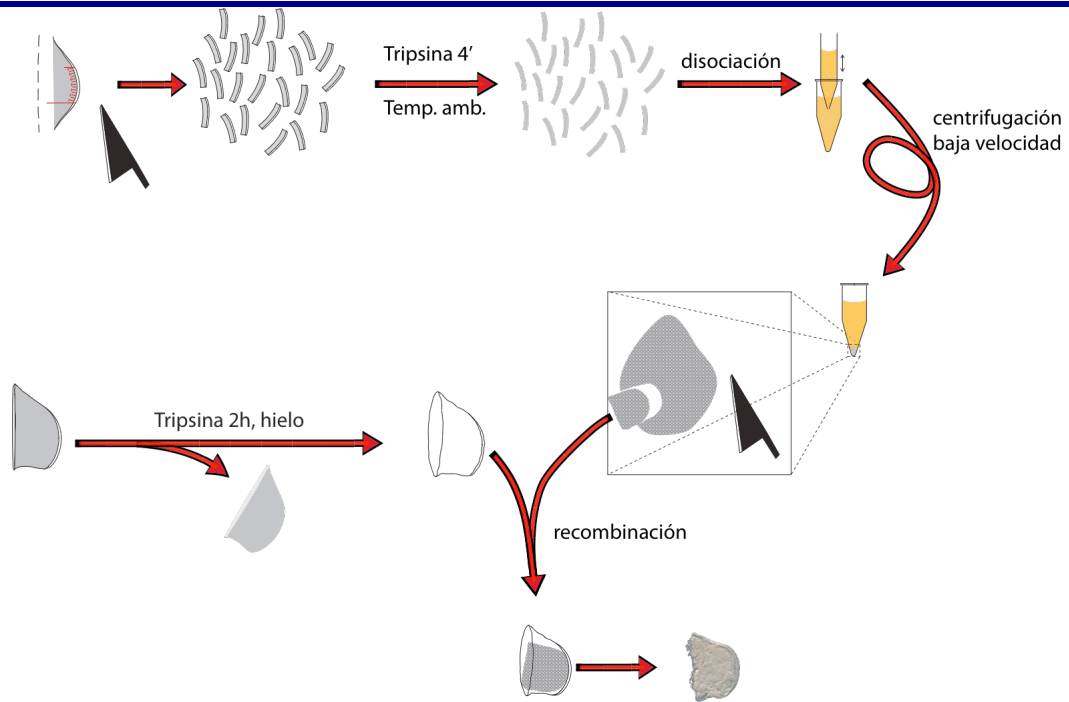
Las microesferas acrílicas heparinizadas se cargaron con FGF8 o FGF4. Para ello, las de tamaño adecuado se arrastraron desde una gota de PBS a una gota del factor de crecimiento en cuestión, disuelto en PBS con 0.1% de BSA. Tras una incubación de 30 minutos – 1 hora, ya se pueden usar. En este caso no se lavan antes de su inserción.

Tras abrir el huevo y las membranas vitelina y amniótica que cubren el primordio de extremidad, se hace una incisión longitudinal con una aguja de tungsteno en la zona deseada. A continuación, con la ayuda de unas micropinzas, se sitúa la microesfera por encima de la herida realizada. Para insertarla en el interior del mesénquima, se usa una pinza roma para empujarla sin romperla. Las microesferas utilizadas se sujetan de manera aceptable sin necesidad de fijarlas con micrograpas (no así las bolas de agarosa Affigel Blue).

Para la inserción apical (entre el mesénquima distal y la cresta ectodérmica), la herida debe realizarse con mucho cuidado insertando la aguja de tungsteno justo en la base de la cresta, y moverla a lo largo del borde hasta que el bolsillo formado tenga el tamaño adecuado para insertar una microesfera. Si se hace bien la herida, no debe haber sangrado.

#### III.2.3.4 Recombinantes de 100 micras distales.

Para esta técnica es importante trabajar lo más rápido posible, porque los fragmentos de extremidad van a pasar bastante tiempo en PBS. Todas las soluciones utilizadas deben ser estériles. La técnica utilizada es muy similar a la que se realiza en el laboratorio de Marian Ros (Dudley *et al.*, 2002), con modificaciones menores. Primero deben seleccionarse un número adecuado de donantes del estadio deseado (por cada 20 donantes se consiguen hacer de 3 a 5 recombinantes, aunque manejar más de 20-25 donantes no es recomendable), y dos o tres donantes de ectodermo (de estadio HH20-21). Para esta tesis, el mesénquima sólo se cogió de los primordios de ala, pero para el ectodermo se usaron indistintamente primordios de ala o de pata. También es importante seleccionar desde un principio un número adecuado de embriones receptores (estadio HH20 para el injerto en somitos, HH24 para el injerto en futuro zeugopodio), de forma que sean los de mejor aspecto y más fácil acceso. Lo óptimo es contar con receptores en exceso, porque durante el proceso de transplante puede que alguno reciba una herida demasiado profunda, o en el caso de los de estadio HH24, que por la orientación del primordio de ala sea muy difícil conseguir que el recombinante se quede en el sitio de injerto.



**Figura M3.** Esquema del procedimiento utilizado para obtener extremidades recombinantes

El procedimiento está esquematizado en la Figura M3. Los donantes de mesénquima se extraen del huevo a una placa de Petri con PBS, donde se lavan y se quita la membrana vitelina. Después se transfieren todos a una placa con PBS limpio, y uno a uno se realiza el siguiente procedimiento: se abre la membrana amniótica, se hace un corte transversal (con unas micropinzas bien afiladas) en los dos primordios que se vayan a usar, en el tercio más posterior, y luego se hace un nuevo corte en la base del primordio, perpendicular al eje próximo-distal. Así se obtienen los dos tercios anteriores de cada primordio. Es necesario descartar la zona más posterior porque se ha visto que puede influir negativamente en el crecimiento del recombinante (Crosby y Fallon, 1975). Una vez se tienen todos aislados, se transfieren a una placa con PBS limpio, y con ayuda de una retícula graduada y un microbisturí, se corta un fragmento distal de 100  $\mu\text{m}$  en el eje próximo-distal, y llegando al ápice de la curvatura en el eje antero-posterior (Fig. M3). Una vez que se han terminado de cortar todos los fragmentos (a veces un poco antes, según el número; además es recomendable contarlos de vez en cuando para no perder ninguno), se procede a extraer del huevo los embriones donantes de ectodermo, y una vez limpios y sin membranas, se cortan por la base los cuatro primordios de extremidad de cada embrión. Dichos primordios se transfieren a una placa con tripsina al 0.5% en PBS, y dicha placa se pone en hielo, para que la digestión sea lenta. A partir de este momento se dispone de unas dos horas para completar el procedimiento. Se retoman entonces los fragmentos de 100 micras, y se transfieren (intentando arrastrar el mínimo volumen de líquido) a una placa con tripsina al 0.5% en PBS. La digestión se realiza a temperatura ambiente (aunque hasta ese momento la placa se guardaba en hielo) y con monitorización constante, hasta que el ectodermo y el mesénquima ya no están íntimamente unidos (suelen ser unos 4 minutos y medio, aunque depende de la actividad de la tripsina, y de la cantidad de PBS que se transfirió junto con los fragmentos). Una vez que esto ocurre, los fragmentos se transfieren, de nuevo arrastrando el menor volumen posible de líquido, a una placa con 10% suero de caballo en PBS, en hielo, para detener la digestión. Tras cinco minutos, los fragmentos se transfieren por tandas a otra placa con 10% suero de caballo en PBS, y con ayuda de unas micropinzas se retiran los ectodermos de dichos fragmentos. En este paso es importante quitar todo el tejido pegajoso, que no es otra cosa que células muertas

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

---

que dificultarán el trabajo posterior. Una vez se tienen todos los fragmentos de mesénquima libres de ectodermo, se cortan en trozos más pequeños y se transfieren a un tubo de 1.5 ml que contiene 1 ml de suero salino G (0.8% NaCl, 0.04% KCl, 0.015%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.015%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.11% D-Glucosa y 4.1 mg/l de rojo fenol), suplementado con 10% suero de caballo. Se procede entonces a su disgregación mecánica mediante una micropipeta P1000 ajustada en 500  $\mu\text{l}$ , realizando movimientos suaves y continuos, hasta que la mayoría de los fragmentos dejen de ser visibles. Para reagregar las células en suspensión, se centrifugan a baja velocidad (2000 – 2500 rpm según el radio de la centrífuga) durante 8 – 10 minutos. El pellet formado se deja entonces reposar 30 minutos a 38°C. Durante ese tiempo, si alguno de los recombinantes se va a tratar con microesferas, éstas se pueden ir preparando y cargando con la sustancia en cuestión. Pasados los 30 minutos, el pellet es transferido a una placa con suero salino G (a temperatura ambiente), donde es recortado en trozos de forma aproximada a un primordio de estadio 22, pero más pequeños en tamaño. Debido a que el pellet no suele ser muy grueso, lo habitual es tener que apilar dos o más capas de tejido recortado para formar un recombinante de grosor adecuado. Para finalizar el proceso, los primordios donantes de ectodermo se pasan, uno cada vez, a una placa con 10% suero de caballo en PBS, y acto seguido a la placa donde se tienen los trozos de mesénquima. Con ayuda de unas micropinzas, el ectodermo es retirado con mucho cuidado para que no se rasgue, como si de un guante se tratara. Suele ocurrir que la cara interna del ectodermo queda hacia el exterior, por lo que hay que darle la vuelta nuevamente (se debe trabajar deprisa porque a temperatura ambiente el ectodermo se contrae rápidamente). Finalmente, los trozos de mesénquima son empujados hacia el interior del ectodermo (suele ayudar sujetar el extremo proximal ventral del ectodermo con una pinza mientras con la otra se trasladan los fragmentos de mesénquima), procurando que se ajusten lo más posible a su forma (si es preciso, se pueden “limar” con la punta de una pinza). El procedimiento se repite para todos los recombinantes que se puedan formar, y luego se dejan reposar 30 minutos – 1 hora para que el ectodermo y el mesénquima recombinen adecuadamente. Durante ese tiempo, los huevos de los embriones receptores se sacan del incubador para que se enfríen un poco y así no sangren demasiado durante el proceso de injerto. Tampoco conviene usarlos muy fríos porque entonces el trasplante “agarra” con dificultad.

En el caso de querer tratar los recombinantes con microesferas cargadas con FGF, una de estas microesferas se coloca en la parte interna distal del ectodermo, antes de introducir el mesénquima. En el caso del resto de microesferas, éstas se insertan en la parte proximal, normalmente colocadas entre las dos capas de mesénquima.

Para el proceso de injerto, el procedimiento utilizado es muy similar al descrito en el apartado III.2.3.1, aunque la herida en zeugopodio se hace algo más grande para facilitar que el recombinante, más voluminoso que una zona de progreso de 200 micras, agarre bien y no se pierda.

#### III.2.3.5 Trazado de linaje con Dil/DiO.

Las soluciones *stock* se preparan en etanol absoluto, la de Dil al 0.5% y la DiO al 0.25%. Se almacena sellado, protegido de la luz y a -20°C. Tiende a formar precipitados, que deben disgregarse mediante *vortex* antes de preparar la solución de trabajo. No es recomendable usar soluciones *stock* de más de 6 meses de antigüedad, por la dificultad en disgregar los precipitados.

Las soluciones de trabajo se preparan inmediatamente antes de su uso diluyendo el *stock* (precalentado 5 minutos a 45°C) 1:9 en una solución 0.3M de sacarosa, 0.1% sulfato de azul Nilo (también precalentada). Después se transfiere a una placa de Petri, y se aspira con un capilar estirado. Para la aspiración e inyección del colorante lipofílico, puede usarse un microinyector equipado con un compresor de aire, o una pipeta de boca, dependiendo de la

precisión que se requiera y la sección del capilar. Los capilares se prepararon mediante un *puller* automatizado.

Para marcaje de ectodermo, el capilar debe tocar la superficie de interés, pero sin llegar a atravesarla. Tras la liberación de una pequeña cantidad de colorante, es conveniente añadir una gota de PBS para diluir la solución sobrante y evitar que marque otras áreas distintas de las de interés. Para marcaje de mesénquima, el capilar debe atravesar el ectodermo, y una cantidad variable de colorante es liberado, según el tamaño de la zona que se quiera marcar.

#### III.2.4 Extracción y genotipado de embriones de ratón.

Para contabilizar el estadio de desarrollo aproximado de los embriones de ratón, las hembras puestas en cruce se examinan para detectar la presencia de un tapón vaginal todas las mañanas. El mediodía del día en que se detecta el tapón se considera día gestacional 0.5 (E0.5).

Una determinación más fina del estadio de desarrollo se lleva a cabo contando los somitos que cada embrión presenta (Chan *et al.*, 2005)

Para obtener los embriones, la hembra es sacrificada por dislocación cervical (salvo que se vaya a tefir su esqueleto, en cuyo caso se asfixia mediante CO<sub>2</sub>), y la cavidad abdominal se abre para exponer el útero, que es transferido a PBS estéril eliminando la mayor cantidad posible de grasa en el proceso. A continuación, trabajando en placa de Petri, la pared muscular que cubre cada decidua es rasgada con cuidado. Si los embriones van a ser genotipados, cada decidua es transferida a una placa individual, para evitar contaminación con tejido de sus hermanos de camada. Finalmente, se rasga con cuidado la membrana de Reicher y el saco vitelino, exponiendo al embrión (todavía cubierto por la membrana amniótica). Dicha membrana amniótica es rasgada y transferida a un tubo de 1.5 ml, que se congelará hasta que se vaya a realizar la extracción de DNA. El embrión es procesado de acuerdo al uso que se le vaya a dar (habitualmente se fija en 4% PFA en PBS toda la noche, o 2% PFA si se quiere conservar la fluorescencia endógena sin aumentar mucho la autofluorescencia).

Para extraer el DNA del saco amniótico, se añaden 600 µl de NaOH 50 mM, se incuban en un termobloque a 95°C con máxima agitación durante 10 minutos, y después se neutraliza con 50 µl de Tris 1M pH 8. Se suele usar 1 µl de esta mezcla para cada reacción de PCR.

**Nota1:** El volumen en que se extrae el DNA del saco se puede ajustar según la cantidad de tejido recogida, que puede depender, entre otras cosas, del estadio del embrión. Si se está extrayendo DNA de una cola de un ratón adulto, el procedimiento es el mismo, pero hay que centrifugar el tubo para que el sobrenadante quede limpio de restos no digeridos.

**Nota2:** La detección del tapón vaginal fue realizada por personal del Animalario del CNIC. La inmensa mayoría de los genotipados de esta tesis fueron realizados por personal técnico del grupo Torres: Silvia Vela, Joana Fuentes y Susana Temiño.

#### III.2.5 Tinción de cartílago (y hueso).

##### III.2.5.1 Alcian Green.

Tras extraer los embriones a una placa con PBS, se decapitan y se evisceran (opcionalmente también se pueden despellejar, si son de estadio muy avanzado). Se fijan toda la noche con ácido tricloroacético al 5%, en agitación y a temperatura ambiente (todos los tratamientos son con agitación y a temperatura ambiente si no se indica lo contrario). Al día siguiente se lavan una vez con agua, y a continuación se tratan como mínimo 2 horas con alcohol ácido (70% etanol, 1% HCl). Después se dejan toda la noche en Alcian Green al 0,1% (se puede reutilizar). Tras esto se lavan una vez brevemente con etanol 70%, y se vuelven a dejar en etanol 70% al

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

---

menos 2 horas. Luego se hace un cambio a 90% etanol, y tras al menos 2 horas, otro a 100% etanol. Por último se cambia de nuevo a 100% etanol y se deja toda la noche. Al día siguiente los embriones se pasan a recipientes de cristal con metil salicilato, hasta que se transparenten. Se almacenan así.

#### III.2.5.2 Victoria Blue.

Los embriones se preparan como en el anterior procedimiento, pero se fijan en 10% formaldehído (formalina). Tras al menos 3 horas de fijación, se lavan varias horas con alcohol ácido. Después se tiñen 1 hora con Victoria Blue al 0.5% en alcohol ácido (se puede reusar). Tras varios lavados con alcohol ácido (hasta que los tejidos blandos ya no estén teñidos), se deshidratan pasando sucesivamente a 90% etanol y 100% etanol. Finalmente, los embriones se transparentan pasándolos primero a etanol: metil salicilato 1:1 y cuando están equilibrados, a metil salicilato puro.

#### III.2.5.3a Alcian Blue/Alizarin Red.

Los embriones (o sólo sus extremidades) se fijan en etanol 95% durante toda la noche, a temperatura ambiente con agitación suave. Conviene despellejar los embriones de ratón mayores de E15, para que se tiñan bien. Después se tiñe el cartílago con solución Alcian Blue (150 mg/l Alcian Blue en 80% etanol, 20% ácido acético) también durante toda la noche. Es importante que el Alcian Blue esté bien disuelto y no haya grumos. Luego, tras varias horas lavando en 95% etanol, las muestras se tratan con 2% KOH, en estático para evitar daños excesivos. Para embriones de ratón de E15.5, E16.5 y E17.5, se tratan 4, 5 y 6 horas, respectivamente. Después se tiñen los huesos con solución Alizarin Red (50 mg/l en 1% KOH), durante 3-4 horas. Por último, las muestras se clarean en 20% Glicerol 1% KOH, y después se guardan en 50% glicerol, 50% etanol.

#### III.2.5.3b Alcian Blue en secciones.

La matriz del cartílago se puede teñir también en secciones de tejido, y es especialmente útil para marcar los elementos esqueléticos sin tener que realizar un protocolo de hibridación *in situ*, que resulta muy agresivo para el cartílago, que se acaba levantando de la sección. Para ello, si las secciones son de parafina, deben rehidratarse y llevarse hasta agua destilada (las secciones congeladas empiezan con este lavado con agua). Después se tratan 30 minutos con una solución de Alcian Blue al 1% en ácido acético 3%, pH 2.5. Luego se lavan con agua destilada, y ya se pueden montar como se desee.

#### III.2.5.4 Alizarin Red en ratones adultos.

El animal es despellejado y eviscerado, y la mayor cantidad posible de grasa es retirada con unas pinzas. Se transfiere a acetona, donde permanecerá tres días para terminar de disolver la grasa. Luego se lava con agua, y es transferido a 2% KOH durante varios días, para disolver los tejidos blandos. Después, se tiñe durante un día con la solución de Alizarin Red anteriormente descrita. A continuación, existen dos opciones: tratamiento con 2% KOH hasta que la mayor parte del tejido blando se destruya, y transparentar con concentraciones crecientes de glicerol; o un método más rápido: deshidratar progresivamente hasta metanol absoluto, y transparentar con BABB (bencil benzoato: ácido benzoico 2:1).



### III.2.6 Hibridación *in situ*.

#### III.2.6.1 Procesamiento previo.

El embrión se fija en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS toda la noche a 4°C. Al día siguiente, si la técnica se va a aplicar sobre el embrión entero, se realizan dos lavados de cinco minutos con PBT a temperatura ambiente en agitación y a continuación se llevan a cabo otros tres lavados durante 10 minutos en agitación a temperatura ambiente, con concentraciones crecientes (50%, 75%) de metanol en PBT y luego metanol puro. Se repite el lavado con metanol puro. Se pueden almacenar los embriones en metanol a –20°C hasta el comienzo de la hibridación *in situ*.

Si la técnica se va a realizar sobre secciones de parafina, se realiza una deshidratación similar, pero lavando con PBS en lugar de con PBT, a 4°C y usando concentraciones crecientes de etanol en agua (30%, 50%, 2x70%, 85%, 95%, 2x100%), 15-25 minutos cada vez, dependiendo del tamaño. Una vez deshidratados, los embriones se tratan 2x20-25 minutos con xilol a temperatura ambiente, y después 3x30 minutos con parafina a 65°C. Todos los lavados, salvo los de parafina, son en agitación. Tras el último lavado de parafina, los embriones son transferidos a un molde con parafina, y manipulados a temperatura ambiente bajo la lupa hasta que permanecen en la orientación adecuada. El bloque se deja solidificar a 4°C, y se almacena a esa temperatura.

#### III.2.6.2 Síntesis de sondas.

Las sondas de RNA anti-sentido se sintetizan con nucleótidos unidos a digoxigenina o fluoresceína (sólo usada para hibridaciones con dos sondas distintas), según las recomendaciones del fabricante (Roche).

#### III.2.6.3a Hibridación *in situ* simple sobre embrión completo.

Las muestras se rehidratan, a temperatura ambiente, con concentraciones decrecientes de metanol en PBST (Tween20 0.1% en PBS): 75%, 50% y 2xPBST 10 minutos con cada disolución. Después se blanquean los embriones tratándolos con 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBST durante al menos 30 minutos. A continuación, tras lavar con PBST, se tratan con proteinasa K diluida en PBST, de acuerdo con la Tabla III (condiciones para señal mesenquimal).

Estadio	[PK]	Tiempo	Estadio	[PK]	Tiempo
20 HH	20 µg/ml	20 min	E9.5	10 µg/ml	8 min
22 HH	20 µg/ml	25 min	E10.5	10 µg/ml	12 min
24-28 HH	30 µg/ml	25-30 min	E11.5	15 µg/ml	12 min
35 HH	60 µg/ml	25 min	E12.5	20 µg/ml	15 min

**Tabla III.** Intensidad y extensión del tratamiento con proteinasa K, según el estadio. Las condiciones para embriones de pollo están indicadas a la izquierda, y para embriones de ratón a la derecha. Si lo que interesa es una señal ectodérmica, entonces el tratamiento es de 10 µg/ml 10 minutos para pollo y 5 µg/ml 5 minutos para ratón.

Pasado el tiempo de permeabilización se retira la solución con mucho cuidado y se lava dos veces con PBST, el primero, muy breve, el segundo de 5 minutos y en agitación. Después se añade la solución de refijado (glutaraldehído al 0.25% en PFA 4%) y se deja actuar durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación. Enjuagar una vez y lavar 2 veces de 5 minutos cada una con PBST a temperatura ambiente y en agitación. Se sustituye el PBST por solución



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

de prehibridación (formamida 50%, 4x SSC pH 4.5, 50 µg/ml heparina, 20 µg/ml tRNA de levadura, 7% Blocking Reagent Solution, 1% SDS) precalentada a 65-70°C. Esperar a que los embriones se equilibren y cambiar la solución de prehibridación. A continuación se incuban los tubos a 65-70°C 2 horas en agitación en el horno de hibridación. Tras ese tiempo, añadir la sonda (3-5µl por cada ml de solución de prehibridación (sin dejar que baje la temperatura) e hibridar a 65-70°C toda la noche en agitación. Al día siguiente se realizan tres lavados de 20 minutos a 65-70°C con solución de posthibridación 1: 50% formamida, 5x SSC, 1% SDS, en agua; y otras tres veces de 20 minutos a 65-70°C con solución de posthibridación 2: 50% formamida, 2x SSC, 0.1% SDS en agua. Seguidamente, enjuagar con TBST (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM KCl, 1% Triton X-100) y lavar con TBST 5 minutos con agitación a temperatura ambiente. Bloquear con una solución 20% de suero de cabra en TBST durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación y a continuación con la solución de bloqueo restante se prepara una dilución del anticuerpo anti-digoxigenina 1:2000 en la que permanecerán los embriones durante toda la noche a 4°C en agitación. Lavar 5 veces de 1 hora con TBST y después se dejan lavando en TBST a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se lavan tres veces de 10 minutos cada una con NTMT pH 9.5 (NaCl 100mM, Tris HCl 0.1M pH 9.5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100) y se revelan con BM purple®. Cuando se detecte señal al nivel deseado, realizar un lavado con PBST y dejar los embriones en PFA 4% donde se pueden almacenar a 4°C indefinidamente.

#### III.2.6.3b Hibridación doble sobre embrión completo.

En este caso se usan dos ribosondas, una marcada con digoxigenina, y otra con fluoresceína. El procedimiento es idéntico para el primer día, con la salvedad de que ambas sondas son añadidas a la mezcla de hibridación. El segundo día, en lugar de aplicar el anticuerpo anti-digoxigenina se aplica el anti-fluoresceína, diluido 1:1000. El sustrato que se usa para revelar la reacción puede ser Fast Red® o BM purple® (la única diferencia es que para el Fast Red® el tampón de revelado es Tris-HCl 0.1M pH 8.2). Para parar la reacción, las muestras se tratan con EDTA 50mM a 60°C durante 10 minutos. A continuación, se lavan las muestras con TBST, se repite el bloqueo con suero de cabra, y se incuba con el anticuerpo anti-digoxigenina 1:2000, que se revelará con el sustrato que no se haya usado anteriormente.

#### III.2.6.4 En secciones de parafina.

Se realizan secciones de microtomo de 7 µm y se colocan en portas Superfrost®. Se dejan secar durante toda la noche a 37°C. Una vez secas, se pueden guardar a 4°C unos pocos meses.

Al día siguiente se desparafinan los portas mediante dos lavados (2x) con xilol de 10 minutos y se lavan 2x10 minutos con etanol absoluto. Después se rehidratan con lavados de 5 minutos en concentraciones decrecientes de etanol en agua (95%, 90%, 70%, 50% y 30%).

Se lavan 2xPBS y se refijan las secciones con PFA 4% 20 minutos para, a continuación, lavar de nuevo 2xPBS. Se digieren 10 minutos con proteinasa K 10 µg/ml en PBS a 37°C, y se lavan 2xPBS. Tras refijar con PFA 4% durante 5 minutos, se lavan con PBS.

A continuación, para permeabilizar más el tejido se desnaturalizan las proteínas con HCl 0.1N 15 minutos, con agitación suave. Tras aclarar con 2xPBS, y para reducir las uniones inespecíficas de la sonda, se acetilan los grupos amino de las proteínas mediante anhídrido acético al 0.25% en trietanolamina 0.1M pH 8, con agitación suave durante 10 minutos. Se lavan en PBS y agua, para después dejar las secciones en solución de prehibridación precalentada (50% formamida, 5xSSC pH 5.5, 1xDenhardt's, 0.1% tween 20, 0.1% Chaps y 50 mg/ml tRNA), durante 2 horas a 65°C. Después se sustituye la solución de prehibridación por otra de igual composición a la que se ha añadido la sonda de RNA marcada con digoxigenina

(1-3  $\mu\text{g}$  por ml de buffer). Se coloca un cubre en cada porta y se deja hibridar a 65-70° C durante toda la noche. Para evitar que las secciones se sequen, se colocan en una cámara húmeda con 50% formamida y 5xSSC pH 5.5.

Al día siguiente se lavan 2x30 minutos a 65-70°C con la solución de posthibridación 1 (50% Formamida, 5xSSC pH 5.5, 1% SDS) y 2x30 minutos a 65°C con la solución de posthibridación 2 (50% Formamida, 2xSSC, 0.2% SDS). Seguidamente, se lavan 3x5 minutos con MABT (100mM de ácido maleico; 150mM de NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5). Se bloquean con 1% blocking reagent (BR) y 10% de suero de cabra (SC) en MABT durante 2 horas, y a continuación, se incuban las secciones con anti-DIG-AP 1:1700 (en 1% BR, 2% SC en MABT) durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, se lavan 3x10 minutos en MABT y, seguidamente, 4x1h en MABT para eliminar restos de anti-DIG-AP. Tras este proceso, se realizan tres lavados de 10 minutos en tampón AP (NaCl 0.1M,  $\text{MgCl}_2$  0.05M, Tris HCl pH 9.5 0.1M, Tween 20 0.1% y Levamisol 1mM). A continuación, se revela la reacción con BM Purple® AP substrate (Roche) en oscuridad durante un tiempo variable.

Una vez obtenido el grado de revelado que se desea, se para la reacción con 2 lavados de PBS de 5 minutos, se refija con PFA 4% durante 15 minutos y se deshidratan los portas lavando con 50%, 70%, 80%, 96% y 2x100% etanol. Después se lava con xilol 2x5 minutos y se montan los portas con Eukitt® o DPX.

#### III.2.7 Congelación de muestras para criostato.

##### III.2.7.1 Inclusión en OCT.

Tras una fijación en 4% PFA en PBS toda la noche (o al 2% si se pretende conservar la fluorescencia endógena sin aumentar mucho la autofluorescencia), los embriones o extremidades se lavan en PBS varias veces, se tratan con 15% sacarosa (crioprotector) en PBS durante 3 horas, y después en 30% sacarosa en PBS toda la noche a 4°C. Después se lavan en OCT, y se embeben con esta sustancia en el molde adecuado. Cuando están en la orientación deseada, se congelan rápidamente poniéndolas en contacto directo con hielo seco o con etanol enfriado a -80°C.

##### III.2.7.2 Inclusión en gelatina-sacarosa.

La fijación y lavados son idénticos al apartado anterior, aunque la criopreservación se hace únicamente con 15% sacarosa en PBS toda la noche. Al día siguiente, las muestras se equilibran en una mezcla de gelatina 7.5% y sacarosa 15% en PBS a 37°C. Mientras tanto, se recubren los pocillos de una placa de 12 pocillos con una pequeña cantidad de gelatina-sacarosa para crear una base sólida. Sobre dicha base, usando una pipeta de plástico recortada, se deposita la muestra (una vez equilibrada), y se orienta. Finalmente se recubren con gelatina-sacarosa y se reajusta la orientación (las pipetas Pasteur cerradas a la llama resultan muy útiles). El bloque se deja solidificar a 4°C, se extrae del pocillo, se talla con una cuchilla y se pega con una gota de pegamento a un trozo de cartulina. Cuando se tienen todos los bloques confeccionados, se congelan a -70°C en isopentano durante 1 minuto. Los bloques se almacenan a -80°C.

#### III.2.8 Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

##### III.2.8.1 Inmunohistoquímica para GFP en secciones de parafina.

Tras disolver la parafina con lavados de xilol, las secciones se rehidratan mediante concentraciones decrecientes de etanol en agua. Tras lavar en PBS, se desenmascara el

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

antígeno mediante digestión enzimática con tripsina (0.05% tripsina, 0.1%  $\text{CaCl}_2$  en agua), 5 minutos a 37°C (la solución enzimática debe ser precalentada). Tras lavar varias veces con PBST (Tween20 0.1%), se bloquean las peroxidasas endógenas tratando 30 minutos con 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  en 50% metanol. Se lavan de nuevo varias veces con PBST para luego bloquear con 10% suero de cabra en PBS durante 1 hora. El anticuerpo primario (policlonal de conejo) se diluye 1:100 en PBS con 10% suero de cabra y se aplica durante 1 hora a temperatura ambiente (t.a.) o a 4°C toda la noche. Después se lavan varias veces con PBST, y se aplica 30 minutos a t.a. el anticuerpo secundario (anti-conejo biotinilado hecho en cabra), 1:300 en PBS. Mientras tanto se prepara el complejo avidina-biotina-peroxidasa (instrucciones del fabricante). Tras varios lavados con PBST, se incuba 30 minutos a t.a. con dicho complejo. Después, es muy importante hacer muchos lavados con PBST, y finalmente se incuba en oscuridad con la solución de revelado (DAB,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el tampón suministrado por el fabricante) durante 5 – 20 minutos. Finalmente se lavan en agua, se contratiñen ligeramente con hematoxilina y se montan.

#### III.2.8.2 Inmunohistoquímica para GFP en secciones de gelatina.

Las secciones (de 8 a 10  $\mu\text{m}$ ) deben desglatinizarse, tratando con PBS a 37°C durante 20 minutos. Después, se lavan varias veces en PBST, y se permeabilizan con 0.5% TritonX-100 en PBS durante 10 minutos. A partir de ahí, se bloquean las peroxidasas endógenas y se sigue el protocolo descrito en el apartado anterior, con la salvedad de que el anticuerpo primario se usa 1:150.

#### III.2.8.3 Inmunofluorescencia en secciones de gelatina.

Las secciones (de 8 a 10  $\mu\text{m}$ ) deben desglatinizarse, tratando con PBS a 37°C durante 20 minutos. Después, se lavan varias veces en PBST. La permeabilización varía según el antígeno sea nuclear (0.5% TritonX-100 en PBS durante 15 minutos), citoplasmático (0.5% TritonX-100 en PBS durante 10 minutos) o de membrana (0.3% TritonX-100 en PBS durante 7 minutos). Tras varios lavados con PBST, se bloquea usando PBS con un 10% de suero del animal en el que esté hecho el secundario. Los anticuerpos primarios se aplicaron preferentemente a 4°C toda la noche (GFP e ITGA9, 1:150; CASP3 1:100;  $\beta\text{GAL}$ , 1:3; CD68, CD206 y MAC3, 1:50 en PBS con 10% suero). Tras varios lavados con PBST, se detectó la señal mediante un anticuerpo secundario conjugado a fluoróforo (1:200 en PBS, 1 hora a t.a.), o mediante uno conjugado a biotina (1:200 en PBS, 1 hora a t.a.) y una streptavidina conjugada a fluoróforo (1:500 – 1:1000 en PBS, 1 hora a t.a.). Finalmente, tras varios lavados con PBST, se incuban con DAPI (1:1000 en PBS, 5 minutos), vuelven a lavarse en PBST, y se montan con un preservante de fluorescencia (Vectashield®).

#### III.2.8.4 TUNEL y $\alpha\text{PH3}$ en secciones de parafina.

Para detectar simultáneamente en la misma sección las células en apoptosis y en división, se realizó el siguiente protocolo: tras desparafinar y rehidratar las secciones, se lavan 5 minutos con agua corriente, y luego con agua destilada. El desenmascaramiento antigénico se realiza mediante tampón citrato 10 mM pH6 en microondas 15 minutos a máxima potencia (el tampón debe precalentarse antes durante 3 minutos). Después las secciones se dejan atemperar 15 minutos, se lavan con PBST y se bloquean 30 minutos con 10% suero de cabra en PBS. Después se incuban con el anticuerpo anti-fosfohistona 3, diluido 1:200 en PBS con 10% suero de cabra, durante 1 hora a 37°C. Tras varios lavados con PBS, las secciones se permeabilizan con 0.5% de TritonX-100 en PBS durante 10 minutos. Se vuelven a lavar con PBST y se pre-incuban durante 15 minutos con tampón TdT (composición comercial) suplementado con  $\text{CoCl}_2$  1mM. Después se incuban 1 hora a 37°C con la mezcla de reacción (tampón TdT  $\text{CoCl}_2$  1mM,

con transferasa terminal y Biotin-16-dUTP, en proporciones recomendadas por el fabricante). A continuación se lava con tampón TdT  $\text{CoCl}_2$  1 mM 10 minutos, y se para la reacción con 0.01% Tween20 en PBS, 2x5 minutos. Tras varios lavados con PBST, la señal se revela mediante un anticuerpo secundario de cabra contra conejo, conjugado con Alexa 488, diluido 1:500 en PBS (fosfohistona 3), y con streptavidina conjugada a Dylight 594, diluida 1:1000 (TUNEL). Finalmente, tras varios lavados con PBST, se incuban con DAPI (1:1000 en PBS), vuelven a lavarse en PBS, y se montan con un preservante de fluorescencia (Vectashield®).

#### III.2.8.5 TUNEL y $\alpha\text{PH3}$ en secciones de gelatina.

Las secciones (de 8 a 10  $\mu\text{m}$ ) deben desgelatinizarse, tratando con PBS a 37°C durante 20 minutos. Después, se lavan varias veces en PBST. Se permeabilizan con 0.5% TritonX-100 en PBS durante 15 minutos. Tras varios lavados con PBST, se bloquean 30 minutos con 10% suero de cabra en PBS. A partir de aquí, se procede como en el protocolo anterior, aunque no hace falta volver a permeabilizar las secciones.

#### III.2.8.6 TUNEL combinado con inmunofluorescencia en el embrión completo.

Los embriones se pueden almacenar deshidratados en metanol durante el tiempo deseado. Tras rehidratarlos como para una hibridación *in situ*, se permeabilizan durante 30 minutos – 1 hora (dependiendo del estadio) con 0.5% Triton X-100 en PBS, a t.a. (todos los pasos son en agitación). Después se lavan varias veces con PBST (Tween 0.1%), y se procede al bloqueo con 10% suero de cabra en PBST durante 2 horas a t.a. La incubación con el anticuerpo primario (diluido en PBST con 10% suero de cabra) se realiza a 4°C toda la noche. Al día siguiente se realizan al menos 5 lavados de 1 hora con PBST. A continuación se incuban con el tampón TdT  $\text{CoCl}_2$  1 mM, 2 horas a t.a. Después se incuban con la mezcla de reacción (tampón TdT  $\text{CoCl}_2$  1mM, con transferasa terminal y Biotin-16-dUTP, en proporciones recomendadas por el fabricante) durante dos horas a 37°C, en agitación (usando un termobloque, por ejemplo). La reacción se detiene con tampón citrato 10 mM, pH6, 15 minutos a t.a. Tras varios lavados de 10 minutos con PBST, se incuban con la mezcla de revelado: una streptavidina conjugada a fluoróforo (1:500 en PBST) y el secundario adecuado), toda la noche a 4°C. El último día se realizan al menos 5 lavados de 1 hora con PBST a t.a., se incuban con DAPI 1:1000 en PBST 1 hora a t.a., y se vuelven a lavar varias veces con PBST. Los embriones así teñidos se almacenan en un preservante de fluorescencia, como Vectashield®.

#### III.2.9 Tinción lacZ.

Los embriones se fijan a temperatura ambiente con agitación en 0.25% Glutaraldehído en PBS, 20 minutos para embriones hasta E10.5, 30 minutos hasta E12.5, 45 minutos hasta E14.5 y 1 hora para más avanzados. Después se lavan 2x10 minutos en PBS, y se equilibran en tampón de lavado (0.1 M tampón fosfato pH 7.3,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, 0.11% deoxicolato sódico, 0.2% Igepal, Tris HCl pH 7.3 20 mM). Finalmente los embriones se tiñen con la solución de revelado (1 mg/ml X-Gal, ferrocianuro potásico 5 mM y ferrocianato potásico 5 mM en tampón de lavado). Las líneas usadas en esta tesis permitían revelar durante toda la noche sin problemas de tinción inespecífica. Tras la tinción, los embriones se refijan en 4% PFA durante un día, se lavan varias veces con PBS y finalmente, o bien se incluyen en OCT o gelatina-sacarosa para cortarlos, o se transparentan con concentraciones crecientes de glicerol hasta alcanzar el 80%. En este último caso se almacenan a 4°C en 80% glicerol.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.2.10 Amplificación y clonaje de nuevas sondas.

En esta tesis se han necesitado ribosondas que no se pudieron conseguir de otros laboratorios, por lo que hubo que clonaras a partir de cDNA obtenido de embriones del estadio adecuado. En nuestro caso, normalmente se trabajó con embriones de ratón de E11.5. El primer paso es extraer el RNA de los embriones (disgregados con un minimortero) mediante el reactivo TriReagent, basado en Trizol (protocolo del fabricante). Usando el RNA como molde, y una mezcla de oligodT se sintetiza el cDNA mediante la transcriptasa reversa Superscript II (protocolo del fabricante). Dicho cDNA sirve de molde para la amplificación por PCR, mediante oligonucleótidos específicos, de la sonda en cuestión. La purificación de dicho producto de PCR se realizó cargándolo en gel, cortando la banda y extrayendo el DNA mediante el kit adecuado de Qiagen. En algunas ocasiones, la banda amplificada se clonó en un vector del tipo pGEMT Easy (con promotores para RNA polimerasas a ambos lados del sitio de clonaje), para después transformarlo en bacterias competentes y poder disponer de *stock* en glicerol y preparaciones de DNA en abundancia. En otras ocasiones, si se preveía que la sonda no se iba a usar muy frecuentemente, la banda de PCR amplificada contenía la secuencia promotora de una polimerasa (típicamente SP6 o T7), para poder usarla de molde directamente en la reacción de transcripción *in vitro*. En la Tabla IV aparecen los oligonucleótidos utilizados para amplificar cada una de las sondas. Salvo que se indique lo contrario, el programa utilizado para amplificar las sondas fue el siguiente:

94°C 3'; 2x(94°C 30", 60°C 30", 72°C 2'); 1x(94°C 30", 58°C 30", 72°C 2'); 2x(94°C 30", 56°C 30", 72°C 2'); 1x(94°C 30", 54°C 30", 72°C 2'); 34x(94°C 30", 52°C 30", 72°C 2'); 72°C 5'; 4°C indefinidamente.

Depdc6 U	5' GGTGTTGTTTCAGGAAGGTGAA 3'
SP6 Depdc6 L	5' ATTTAGGTGACACTATAGACAGATTTGGGGTTGCAGAG 3'
Hddc3 U	5' AGCGACGAAAAGATCCTGAA 3'
SP6 Hddc3 L	5' ATTTAGGTGACACTATAGTGAAGCCCTTTTACCACCTG 3'
RIKEN 1E04	5' TCAGCAATGACATGGAGGAA 3'
SP6 RIKEN1E04 L	5' ATTTAGGTGACACTATAGTGCAGTCTGGCTCAGAAGAA 3'
Crebzf U	5' AAACGCGGATAAAGAGCAGA 3'
SP6 Crebzf L	5' ATTTAGGTGACACTATAGAGCACTGCAGGAGGAGAGTC 3'
Col4a6 U	5' AAGGGAGACATTGGTGTTCG 3'
SP6 Col4a6 L	5' ATTTAGGTGACACTATAGAGGGAACCCAGGCTCTATGT 3'
Brd8 U	5' ACAGGGGTTCTCTTGGAGGT 3'
SP6 Brd8 L	5' ATTTAGGTGACACTATAGCCTGAGCGGAAACACTCTTC 3'
Ntn4 U	5' CCACCGAACTCTTCTGCTTC 3'
SP6 Ntn4 L	5' ATTTAGGTGACACTATAGGTCTTCTGAGGTCGCGGTAG 3'
Fzd6 U	5' TCTGTGCCTCTGCGTATTTG 3'
SP6 Fzd6 L	5' ATTTAGGTGACACTATAGTTCGCTCCTGTGCTAGTTCC 3'
Lmo4 U	5' GGACCGCTTTCTGCTCTATG 3'
SP6 Lmo4 L	5' ATTTAGGTGACACTATAGTTAACCTGAACCCCAAGCTG 3'
Tcfap2e U	5' GTTGCTCAGCTCAACATCCA 3'
SP6 Tcfap2e L	5' ATTTAGGTGACACTATAGCCTCCAAAGCCATGAGTGAT 3'
Adamts8 3UTR U	5' AGGTCTTCCCTCCAAAAGTC 3'
SP6 Adamts8 3UTR L	5' ATTTAGGTGACACTATAGGCCTAAGAGATTTCCACCAA 3'
Adamts8 cod U	5' GTGAATGGAGAACGGGAGT 3'
SP6 Adamts8 cod L	5' ATTTAGGTGACACTATAGATCAGCCACCAGAAGTGTTT 3'
Eps8 U	5' TGAATCAGGGAATGAAAGC 3'
T7 Eps8 L	5' TAATACGACTCACTATAGGGCTGGAACCAAGTCCAGGTGTT 3'
Ablim1 U	5' CCAGCAAGTAAGATGCCACA 3'
T7 Ablim1 L	5' TAATACGACTCACTATAGGGTACCACCCTGTGTGATTGGA 3'

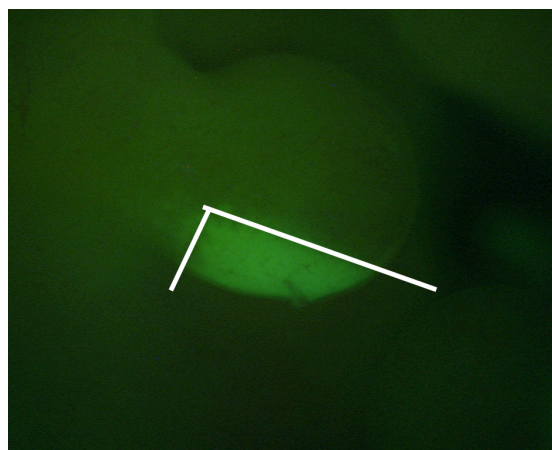


Zbp1 U	5' GCTATGGCTCTGGGAGACAG 3'
T7 Zbp1 L	5' TAATACGACTCACTATAGGGCACATCCTCTTCTGGCCAAT 3'
E20 U	5' CCCAGACGTAGAGAGCTTGG 3'
T7 E20 L	5' TAATACGACTCACTATAGGGTGGGGTAAGAAACGAAGTGG 3'
Pcdh8 U	5' GCAGAAGACCTGCACATGAA 3'
T7 Pcdh8 L	5' TAATACGACTCACTATAGGGCAACTCCTGTAGCAGCACCA 3'
Pick1 U	5' TCCCTGGACATTGTGTTGAA 3'
T7 Pick1 L	5' TAATACGACTCACTATAGGGCGTGTATCAGGGATGGCTTT 3'
Zrf1 U	5' ACAGCCCCTGCTGTAGCTTA 3'
T7 Zrf1 L	5' TAATACGACTCACTATAGGGGTAAAGGTGGTCCCTGTCCA 3'
Itga9 U	5' TTCTGCCTAACGTTGCACTG 3'
T7 Itga9 L	5' TAATACGACTCACTATAGGGACAGCCAGCAGCAGAAAAAT 3'
Rab6b U	5' CAACCATCGGGATTGACTTC 3'
T7 Rab6b L	5' TAATACGACTCACTATAGGGAGGCTTGTCCAGCTTGATGT 3'
mCyp26b1 lit U	5' GGCAATCTTTTCTCTCTCTC 3'
mCyp26b1 lit L	5' ACTCCAGGGTTCCATCCTTC 3'
Prog. mCyp26b1	94°C 3'; 25x(94°C 30", 58°C 30", 68°C 1'30"); 68°C 5'; 4°C indef.

**Tabla IV.** Oligonucleótidos y condiciones utilizadas para generar moldes para las ribosondas indicadas

### III.2.11 Análisis de expresión diferencial: experimento de *microarrays*.

Para comparar el transcriptoma de extremidades silvestres con aquellas en las que el linaje de células que expresaron *Shh* se ven forzadas a sobreexpresar *Meis2* (ver último apartado de resultados), se extrajeron embriones E11.5 (45-48 somitos) con tres posibles genotipos: *ShhGFPCre/+*; *ROSA26R-Meis2a-IRES-EYFP/+* (condición Hetero), *ShhGFPCre/+*; *ROSA26R-Meis2a-IRES-EYFP/ROSA26R-Meis2a-IRES-EYFP* (condición Homo) y *ShhGFPCre/+*; *ROSA26R-EYFP/+* (condición Control). Aprovechando la fluorescencia existente en todas las condiciones, los embriones fueron brevemente iluminados con la longitud de onda adecuada para localizar la zona de interés en la extremidad, que fue cortada con unas pinzas extremadamente afiladas (Fig. M4). Cada uno de esos trozos fue congelado, con la menor cantidad posible de PBS, en un tubo colocado en hielo seco. Se recogieron en un mismo tubo los fragmentos correspondientes a las 4 extremidades de 2 o 3 embriones, porque pruebas anteriores revelaron que ésa era la cantidad de tejido necesaria para obtener suficiente RNA para conformar una réplica biológica (1.7 µg de RNA en 10 µl de agua libre de RNasas). Se recogió suficiente material para 5 réplicas de la condición Homo, 3 de la condición Hetero y 3 de la Control.



**Figura M4.** Región aislada para el experimento de *microarrays*

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

---

Una vez que todo el tejido necesario se encontraba en el tubo, se extrajo el RNA mediante el kit RNAeasy de Qiagen, con un paso añadido de digestión de DNA genómico en columna mediante la DNasa del kit Absolutely RNA de Stratagene. Las relaciones de absorbancia OD260/OD280 así como OD260/OD230 fueron medidas para cada réplica, y sólo las muestras con valores mayores de 1.9 y 1.6, respectivamente, fueron usadas para el experimento. Se descartó en base a ello una de las réplicas de la condición Homo. Complementariamente se realizó una comprobación adicional de la calidad del RNA cargándolo en un gel de agarosa.

Las 10 réplicas biológicas, más una réplica técnica de una de las muestras Hetero, fueron tratadas por el servicio de Genómica del CNIC e hibridadas en un mismo chip de Agilent Technologies, lo que permitía poder hacer comparaciones cuantitativas entre muestras. De las 41090 sondas presentes en el chip Agilent 4x44K, 7372 superaron los diversos criterios de filtrado inicial. Sobre estos últimos se aplicó el paquete bioestadístico Limma para analizar la expresión diferencial de genes. Finalmente, los p-valores crudos fueron corregidos para la Tasa de Falsos Positivos (False Discovery Rate) mediante el método de Benjamini-Hochsberg. Estableciendo un límite superior de 0.05 para el p-valor corregido, la lista de genes candidatos se redujo a 47 sondas que mostraban aumento de expresión (de al menos el doble) y 50 que mostraban disminución (de al menos 2 veces), al comparar la condición Homo con la Control. La muestra Hetero presentaba bastante variabilidad, de modo que la lista de candidatos que superaba todos los criterios mencionados era mucho más reducida. En cuanto a la comparación de las muestras Homo y Hetero entre sí, ninguna sonda mostró una diferencia significativa, probablemente debido en parte a la mencionada variabilidad de la muestra Hetero.

#### III.2.12 Captura, análisis y procesamiento de imagen.

Las imágenes de embriones enteros se capturaron con una lupa Leica MZFLIII equipada con una cámara Nikon DXM1200F (programa ACT-1). Las secciones se fotografiaron en un microscopio Nikon Eclipse 90i equipado con una cámara Nikon DXM1200C (programa NIS elements). Para el análisis de muerte y proliferación celular en recombinantes, se fotografiaron secciones confocales en un microscopio Nikon A1R, y los objetos en cada canal fueron identificados y cuantificados con el programa Cell Profiler. Sólo las secciones con altas relaciones señal/ruido fueron empleadas, para minimizar el error debido al recuento automático. Para la captura multicampo de las inmunofluorescencias del proyecto de sobreexpresión de *Meis2* se empleó el microscopio confocal Leica SP5.

El programa Adobe Photoshop® se usó para ajustar el brillo y el contraste de algunas imágenes, especialmente las de hibridación in situ en secciones. Los niveles del canal del TUNEL también fueron ajustados para que resultaran visibles en la versión impresa de las imágenes.

La cuantificación y clasificación de los clones LACZ y MEIS2 no se pudo realizar automáticamente, porque los parámetros que resultaban adecuados para algunas secciones no lo eran para otras. Por tanto, se contó manualmente el número de células de cada tipo, separando por regiones (estilopodio, zeugopodio y autopodio), y clasificándolas según el tamaño de los grupos de células en contacto.



## **IV. RESULTADOS**



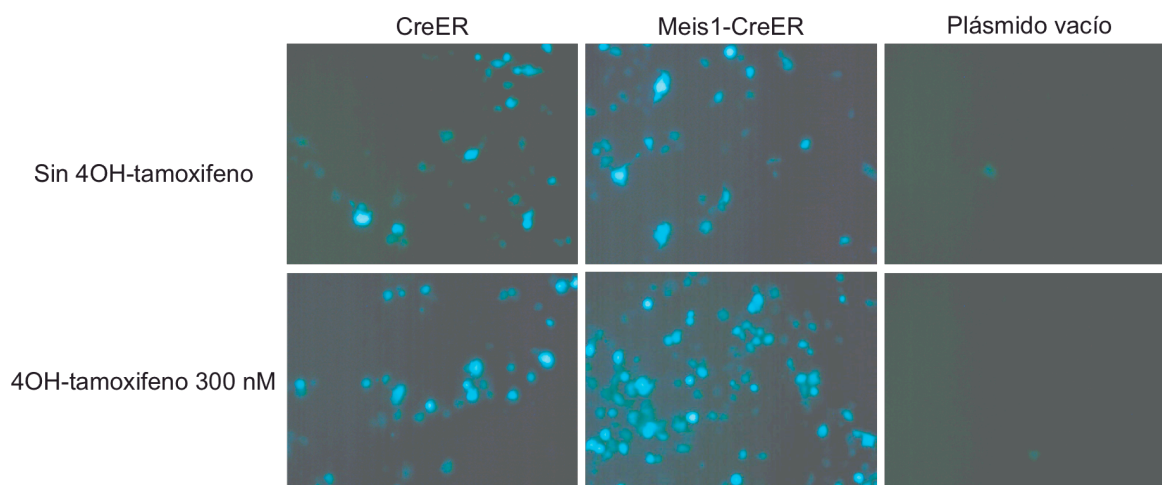
## IV.1. Trazado de linaje de las células que expresan *Meis1*, *Hoxa11* y *Hoxa13* en la extremidad.

### IV.1.1 Generación de las líneas *Meis1*<sup>CreERT2/+</sup>, *Hoxa11*<sup>CreERT2/+</sup> y *Hoxa13*<sup>CreERT2/+</sup>.

La construcción de los vectores de *targeting*, modificación de células ES y generación de animales quiméricos ha sido descrita en la sección Materiales y Métodos. Los primeros cruces de cada línea (excepto para *Meis1*<sup>CreERT2/+</sup>) se realizaron con la línea *Flpe deleter*, para eliminar el gen de resistencia a Neomicina (NeoR). Los individuos de la F1 positivos para el transgén Cre y negativos para el transgén NeoR se cruzaron a su vez con ratones de las líneas testigo R26R (Soriano, 1999) y R26R-EYFP (Srinivas *et al.*, 2001) hasta obtener la modificación en homocigosis del *locus* Rosa26. En cambio, para la línea *Meis1*<sup>CreERT2/+</sup>, se realizaron experimentos tanto con el transgén NeoR como sin él, y sólo se realizaron cruces con el testigo R26R.

En el caso de la línea *Meis1*<sup>CreERT2/+</sup>, la recombinación homóloga daba lugar a que entre el codón de iniciación de *Meis1* y el del gen de la Cre recombinasa quedaran 39 nucleótidos (no sólo pertenecientes al gen *Meis1*, sino también al sitio de clonaje múltiple del plásmido utilizado), que al traducirse darían lugar a una recombinasa quimérica con 13 aminoácidos extra en el dominio N-terminal. Para saber cuánto afectaba eso a su actividad, se realizó un ensayo *in vitro*. La región codificante del gen CreER<sup>T2</sup> y de la versión quimérica Meis1-CreER<sup>T2</sup> fueron clonadas en el vector de expresión pCAGGS/SE (Materiales y métodos). Dichos vectores, junto con un vector que daba lugar a la expresión de GFP en presencia de actividad Cre (pZ/EG) se transfectaron (por parejas Cre + testigo) en células 293T mediante lipofectamina. Tras 24 y 48 horas de cultivo con y sin 4-hidroxitamoxifeno (4HT) en el medio, se observaron con un microscopio de fluorescencia invertido. La versión quimérica Meis1-CreER<sup>T2</sup> resultó funcionar de manera similar a CreER<sup>T2</sup> (Fig. R1), si bien llamaba la atención en ambos casos que en ausencia de 4HT mostraban altos niveles de actividad, aunque menores que al tratar con la droga. Dicha actividad en ausencia de inducción se achacó a que los altos niveles de expresión alcanzados con la transfección daban lugar a que no toda la proteína producida pudiera ser secuestrada en el citoplasma y a que una parte alcanzara el núcleo, produciendo la recombinación en el vector testigo.

Se concluyó por tanto que la versión quimérica conservaba intacta su actividad.



## IV. RESULTADOS

**Figura R1 (página anterior).** Ensayo de actividad de la versión quimérica de Cre recombinasa. Las condiciones de cultivo están indicadas a la izquierda. De izquierda a derecha aparecen fotos representativas de las células transfectadas con CreER<sup>T2</sup>, Meis1-CreER<sup>T2</sup> y plásmido vacío, respectivamente. Además, en todas las condiciones se cotransfectaron las células con el plásmido pZ/EG (testigo de actividad Cre). Las imágenes fueron tomadas a las 48 horas de cultivo.

### IV.1.2 Trazado de linaje.

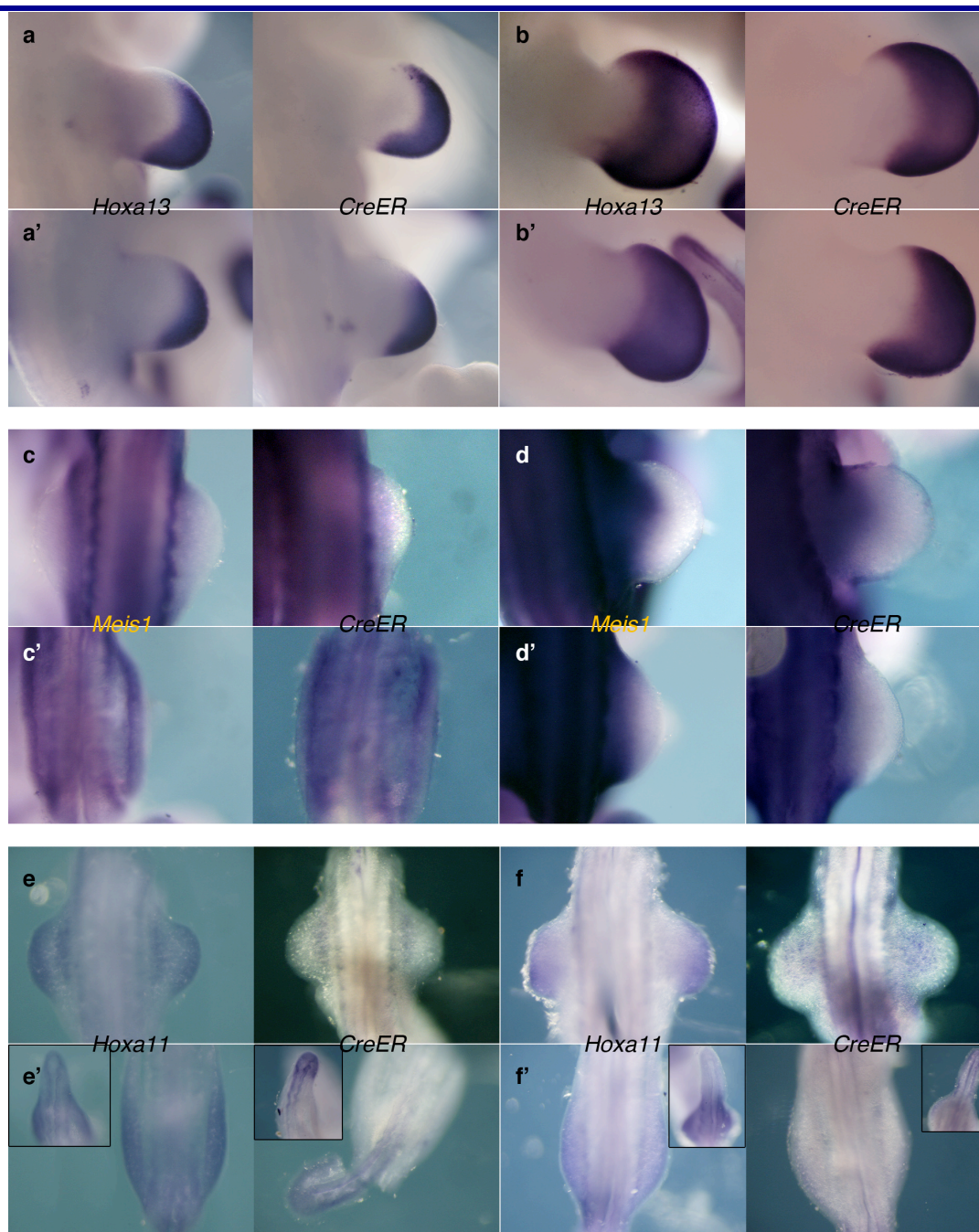
Un control previo importante consistía en asegurarse de que la expresión de la Cre recombinasa recapitulaba la del gen cuyo linaje se quería trazar. Para ello, haciendo uso de uno de los plásmidos empleados durante la construcción de los vectores de *targeting*, se sintetizó una ribosonda que reconocía el mensajero de la recombinasa inducible y se llevaron a cabo hibridaciones *in situ* en embriones de distintos estadios comparando su expresión con la de los genes modificados. Los resultados indicaban que para la línea *Hoxa13*<sup>CreERT2/+</sup>, tanto los niveles como la localización de la expresión de CreER<sup>T2</sup> a distintos estadios eran muy similares a los de la expresión de *Hoxa13* en individuos silvestres de los mismos estadios (Fig. R2a – b'). En el caso de la línea *Meis1*<sup>CreERT2/+</sup>, si bien la localización de la expresión era muy similar, los niveles de expresión de CreER<sup>T2</sup> parecían menores que los de *Meis1* (Fig. R2c – d'), sobre todo si estaba presente el gen NeoR (Material Suplementario, Fig. S1). Aunque los niveles de expresión alcanzados tras hibridaciones *in situ* con dos sondas distintas no son muy comparables, de ser cierto el resultado, podría afectar negativamente a la frecuencia de inducción de clones. Finalmente, la línea *Hoxa11*<sup>CreERT2/+</sup> resultó no ser válida para nuestro estudio, porque si bien la expresión en los precursores musculares sí se mantenía, la expresión de CreER<sup>T2</sup> en el mesénquima de la extremidad y en el primordio de la cola no recapitulaba la de *Hoxa11* (Fig. R2e – f').

En el caso de la línea *Hoxa13*<sup>CreERT2/+</sup>, se realizaron inyecciones puntuales intraperitoneales de 4HT, bien a E9.5, 10, 10.5, 11 u 11.5. Se inyectaron 0.8 – 1 mg de 4HT, para conseguir la máxima recombinación sin producir efectos teratogénicos. La distribución de clones se analizó sobre todo con la línea R26REYFP.

Para la línea *Meis1*<sup>CreERT2/+</sup> se inyectó tamoxifeno (3 mg) a hembras que llevaban gestantes 8.5, 9.5 y 10.5 días. Se decidió usar tamoxifeno en lugar de 4 HT para poder inyectar una mayor cantidad, en previsión de la baja frecuencia de clones esperada dados los resultados del apartado anterior (Susan Mackem, comunicación personal). La distribución de clones se analizó con la línea R26R (lacZ).

En cuanto a cuándo se producía la recombinación una vez inyectado el 4HT, se ha descrito que ocurre entre 6 y 18 horas tras la inyección, con un máximo a 12 horas (Arques *et al.*, 2007)). En el caso de usar tamoxifeno, que debe ser procesado en el hígado, los eventos de recombinación ocurren con algo más de retraso (entre 12 y 24 horas después de la inyección, con un máximo a 18 horas (Nakamura *et al.*, 2006)).

En ambos casos, el análisis de la distribución de clones se realizó a E13.5, bien en secciones o en la extremidad completa.



**Figura R2.** a – f', Comparación de la distribución del mensajero *CreERT<sup>T2</sup>* con la de *Hoxa13* (a – b'), *Meis1* (c – d') y *Hoxa11* (e – f'), según se indica. Se muestran tanto primordios de extremidad superior (a,b,c,d,e,f) como inferior (a',b',c',d',e',f'), del mismo espécimen. Los estadios mostrados, en pares de somitos, son: 41 (a y a'), 25 (c y c'), 36 (d y d'), 27 (e y e') y 31 (f y f'). En día gestacional: E11 (a y a'), E11.75 (b y b'), E9.7 (c y c'), E10.5 (d y d'), E9.75 (e y e') y E10.3 (f y f'). En c – d', se hace notar que la expresión de *CreERT<sup>T2</sup>* era algo más intensa cuando el cassette de resistencia a Neomicina fue eliminado (datos mostrados), que cuando estaba presente (Fig. S1, en el Material Suplementario). En e' y f', los detalles muestran la expresión en el primordio de cola. Para ver la expresión de *CreERT<sup>T2</sup>* en estadios más avanzados de la línea *Hoxa11<sup>CreERT2/+</sup>*, consúltese la Fig. S2.

#### IV. RESULTADOS

---

Ejemplos representativos para algunos estadios y un resumen del trazado de linaje realizado aparecen en la Figura R3. Como mínimo se analizaron 2 y más frecuentemente 4 extremidades de cada tipo (superior e inferior). En el caso del linaje *Hoxa13*, llamaba la atención que desde el momento más temprano de marcaje (E9.5), gran parte del autopodio era susceptible de ser marcado, salvo el dedo 1 y los carpos/tarsos (Fig. R3a, a', i, y R4). Al inyectar a E10, el marcaje se extendía siempre hasta el dedo 1 y también a los tarsos, pero no a los carpos (Fig. R3b, b', i). Sólo a partir de la inyección a E11 el marcaje se extendió a los carpos (Fig. R3d, i). A lo largo de la secuencia temporal de inyecciones, se observó un acusado incremento de la frecuencia de marcaje (representado como un gradiente de color en la Figura R3i). En definitiva, la conclusión principal fue que en los estadios analizados, la expresión de *Hoxa13* marca sólo precursores de autopodio.

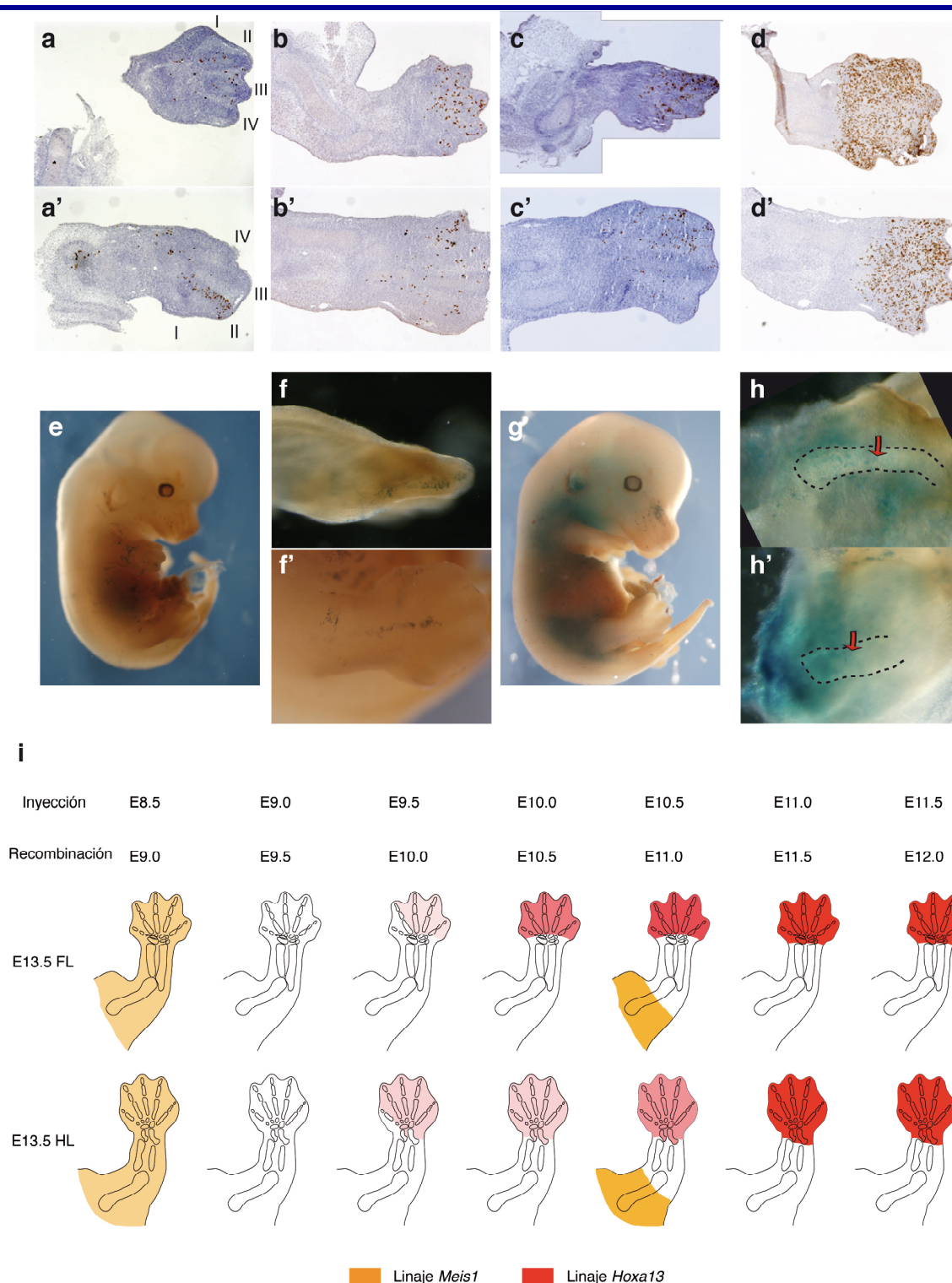
Además de los clones detectados en condensaciones y tejido mesenquimal circundante, se observaron también clones en haces musculares que se extendían desde la parte distal del estilopodio hasta el autopodio, sobre todo en la extremidad inferior marcada tempranamente (no mostrado). Esto era de esperar, dada la expresión descrita para *Hoxa13* en los precursores musculares (Hashimoto *et al.*, 1999; Yamamoto y Kuroiwa, 2003).

En el caso del linaje *Meis1*, se confirmó la sospecha de que la frecuencia de marcaje conseguida era baja (Fig. R3e y e'), pero se juzgó suficiente para el análisis que se pretendía. Es destacable que las imágenes mostradas son de embriones que mantenían el gen NeoR, y que por tanto seguramente expresaban niveles más bajos de *CreER*<sup>T2</sup>. Tras la inyección de tamoxifeno a E8.5, las extremidades presentaban clones que podían estar distribuidos a lo largo de todo el eje P-D (Fig. R3e, f, f', i). Es decir, se observó marcaje tanto en estilopodio (Fig. R3i), como en zeugopodio y autopodio (Fig. R3f, f', i). Resultaba interesante que dada la baja frecuencia de inducción, en muchas ocasiones lo que parecía ser un solo clon estaba presente en el autopodio, y respetaba el límite dorso-ventral descrito anteriormente (Arques *et al.*, 2007; Pearse *et al.*, 2007) (Fig. R3f).

La inyección a E10.5 dio lugar a clones mesenquimales que sólo marcaban parte del estilopodio, así como la escápula y la cadera (Fig. R3g, h, h', i). Es decir, conforme avanza el desarrollo, la contribución P-D de las células que expresan *Meis1* va disminuyendo, como sugiere la dinámica de su dominio de expresión, que se va restringiendo a regiones cada vez más proximales (Mercader *et al.*, 2009). Lo que sí resultó sorprendente fue el hecho de que no todo el estilopodio resultara marcado, teniendo en cuenta que se ha descrito que la expresión de *Meis1* llega hasta el codo en estadios en que los elementos cartilaginosos ya son visualizables, al menos en el embrión de pollo (Mercader *et al.*, 1999).

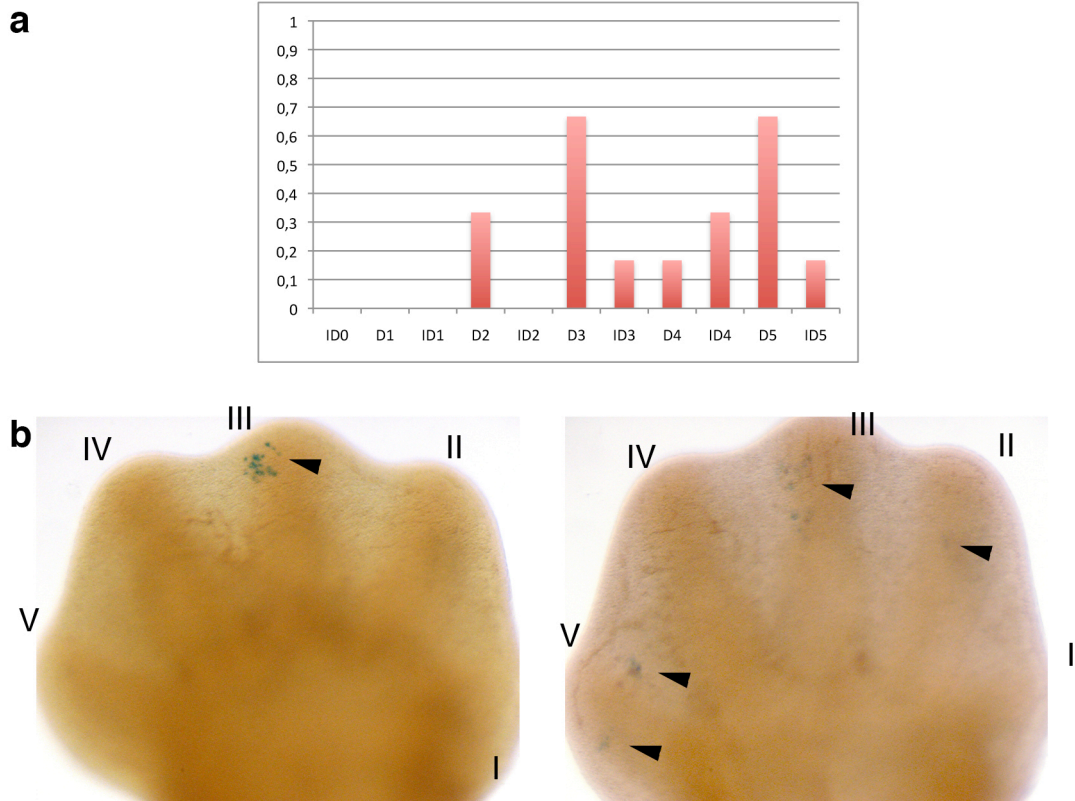
En cualquiera de los estadios analizados, se observaron clones ectodérmicos que no estaban excluidos de ninguno de los 3 elementos P-D. Esa observación correlacionaba bien con el hecho de que la expresión ectodérmica de *Meis1* llega a niveles más distales que la mesenquimal en cualquier estadio (ver datos de pollo en Fig. D2, en las Discusión).





**Figura R3.** Trazado de linaje de las células que expresan *Hoxa13* y *Meis1* en la extremidad. **a - d'**, Ejemplos representativos de secciones de criostato (8 micras) de extremidades *Hoxa13*<sup>CreERT2/+</sup> de E13.5 teñidas con un anticuerpo anti-GFP y contrateñidas con hematoxilina. Se muestran extremidades superiores (**a, b, c, d**) e inferiores (**a', b', c', d'**). Los tiempos de inyección de 4HT fueron: E9.5 (**a, a'**), E10 (**b, b'**), E10.5 (**c, c'**) y E11 (**d, d'**). **e - g'**, Ejemplos representativos de embriones (**e, g**) y extremidades *Meis1*<sup>CreERT2/+</sup> de E13.5 tras la tinción lacZ. Se muestran extremidades superiores (**f, h**) e inferiores (**f', h'**). Los tiempos de inyección de tamoxifeno fueron: E8.5 (**e, f, f'**) y E10.5 (**g, h, h'**). En **h y h'**, el contorno del húmero/fémur aparece punteado, y la flecha indica la posición de la célula más distal marcada. El eje P-D de las extremidades discurre de izquierda a derecha. **i**, Esquema resumen del trazado de linaje. En la parte superior se indican los tiempos de inyección, así como el momento estimado para el máximo número de eventos de recombinación. Los linajes *Meis1* y *Hoxa13* aparecen coloreados según se indica, y la intensidad de la coloración es proporcional a la densidad de clones observada. La numeración romana identifica los dedos.

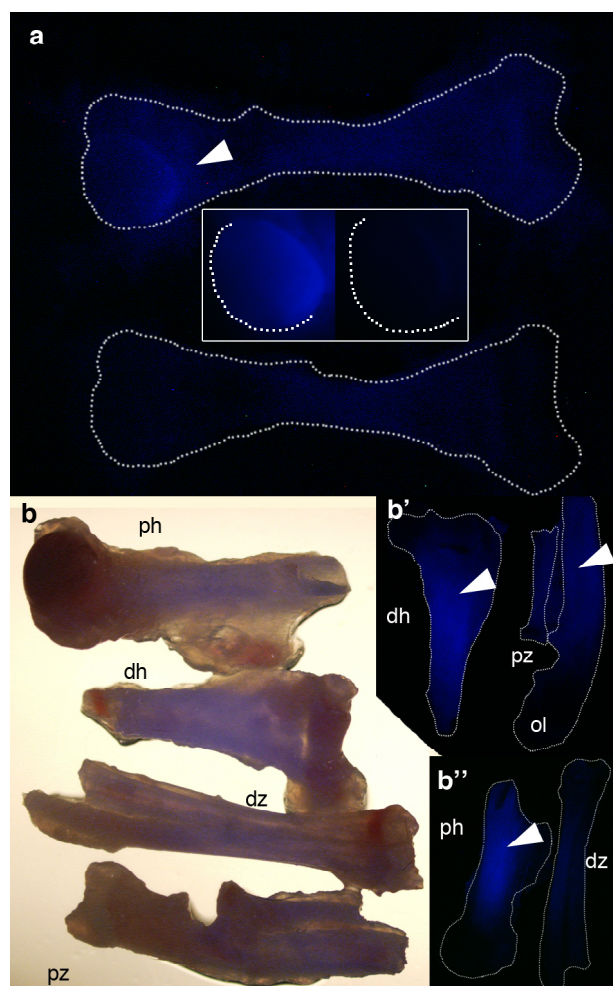




**Figura R4.** Distribución del linaje de las primeras células que expresan *Hoxa13* en la extremidad. **a**, La gráfica representa la frecuencia de marcaje, en cada dedo (D) e interdígito (ID), del linaje más temprano de *Hoxa13* (inyección de 4HT a E9.5). Los datos consisten en la media de 6 extremidades superiores, en las que se tenía la seguridad de que el linaje marcado no pertenecía a precursores musculares, mientras que con las extremidades inferiores no existía esa seguridad. En la Fig. S3 (Material Suplementario) aparece la misma gráfica pero incluyendo los datos de otras 6 extremidades pertenecientes a otra camada más avanzada de lo planeado. **b**, Ejemplos de dicho marcaje temprano: visión dorsal de una extremidad superior izquierda (panel izquierdo) y ventral de una extremidad superior derecha (panel derecho). Las puntas de flecha señalan los clones, y la numeración romana la identidad de los dedos.

## IV.2. Expresión de *Meis1* en la extremidad adulta.

En el laboratorio se había generado con anterioridad una línea *Knock In* de ratón que expresa la proteína fluorescente cian (CFP) con la misma distribución que MEIS1 (G. Giovinazzo y M. Torres, no publicado). Haciendo uso de esta herramienta, se realizó la interesante observación de que tanto los individuos neonatos como los adultos presentan fluorescencia en los elementos esqueléticos de la extremidad (Fig. R5). Puesto que *Meis1* se expresa en algunas células hematopoyéticas, se lavó la médula ósea tras partir los huesos largos para tener la seguridad de que la fluorescencia observada se localizaba en el elemento esquelético. La fluorescencia en los animales neonatos se observó sobre todo en la epífisis proximal del húmero (Fig. R5a) y algo menos intensa en la distal (no mostrado). En los adultos, la fluorescencia se apreciaba a lo largo de todo el húmero, pero sobre todo en la parte distal (Fig. R5b – b''). Sorprendentemente, también se observó señal fluorescente, aunque débil, en la región proximal de los elementos del zeugopodio, excepto en el olécranon (Fig. R5b' y b''). Este resultado fue inesperado porque, como ya se ha visto en el apartado anterior, a partir de cierto estadio la expresión de *Meis1* queda restringida al futuro húmero.

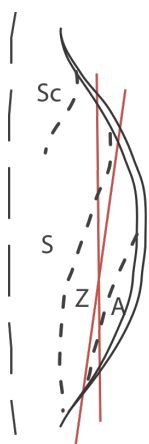


**Figura R5.** Expresión de *Meis1* en la extremidad de neonatos y adultos. **a**, Comparación de la señal fluorescente de los húmeros de un neonato *Meis1*<sup>CFP/+</sup> (arriba) y un neonato silvestre (abajo), en el mismo campo fotográfico. La punta de flecha señala la señal fluorescencia en la epífisis proximal. El detalle muestra un aumento de dicha epífisis en el animal *Knock In* (izquierda) y el silvestre (derecha). En este caso, las fotografías fueron tomadas con las mismas condiciones de iluminación, exposición y tratamiento digital posterior. **b**, Comparación entre húmero proximal (ph) y distal (dh), y zeugopodio proximal (pz) y distal (dz) de un adulto *Meis1*<sup>CFP/+</sup>, en el mismo campo fotográfico. La imagen de campo claro y la de fluorescencia se han superpuesto. **b'**, Comparación entre el húmero distal y el zeugopodio proximal del mismo individuo. Las puntas de flecha señalan lo que se estimó como señal positiva. Nótese que en el olécranon (ol), no hay señal. **b''**, *Idem*, pero comparando húmero proximal con zeugopodio distal. Por el momento se ha analizado un espécimen (las dos extremidades superiores) de cada tipo.

### IV.3. Papel de mecanismos autónomos y no autónomos en la formación de patrón próximo-distal.

#### IV.3.1 Evaluación del modelo de transplante distal como ensayo de reprogramación de las células de la extremidad.

Para comprobar el efecto que las señales endógenas pueden tener en el estado de especificación de las células de la extremidad, se decidió transplantar la punta distal del primordio de extremidad en distintos estadios de desarrollo a diversas localizaciones donde el entorno local de señales es distinto. Para la mayor parte de los experimentos se utilizaron primordios de extremidad inferior (pata en adelante). Aunque mayor en el primordio de ala que en el de pata, ambos presentan un sesgo posterior en el mapa de destinos (Saunders, 1948; Vargesson *et al.*, 1997), por lo que se decidió que el corte para obtener la punta distal del primordio debía hacerse inclinado hacia la región posterior. De esta manera, se podrían coger células pertenecientes a destinos próximo-distales más uniformes que si el corte se hiciera paralelo al flanco del embrión (Fig. R6).



**Figura R6.** Comparación de los dos tipos de corte mencionados. El esquema representa un primordio idealizado, indicando los distintos destinos próximo-distales: escápula (Sc), estilopodio (S), zeugopodio (Z) y autopodio (A). Las líneas rojas representan los dos posibles planos de corte: paralelo al flanco del embrión, o inclinado hacia posterior para compensar el sesgo posterior del mapa de destinos. Nótese cómo en el primer caso se estarían cogiendo células destinadas a formar los tres segmentos próximo-distales, mientras que al hacer el corte inclinado, sólo se cogen células destinadas a ser zeugopodio y autopodio. En estadios más avanzados, el corte inclinado permite coger células destinadas a formar parte exclusivamente del autopodio.

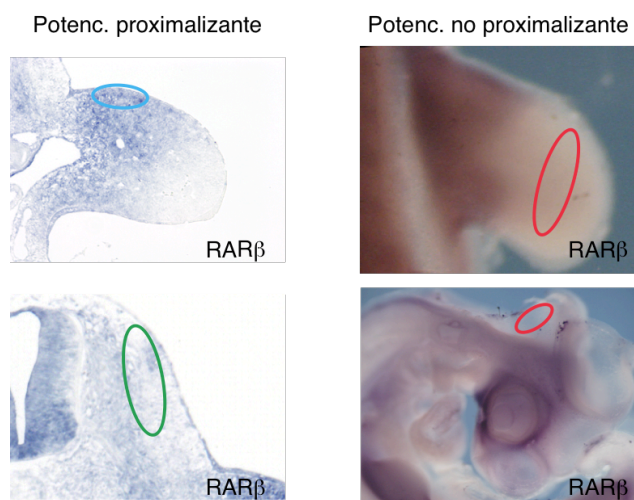
Sin embargo, antes de realizar el ensayo con las señales endógenas, se quiso comprobar que el abordaje permitía detectar cambios en el estado de especificación de las células. Para ello, nos basamos en experimentos clásicos de regeneración de extremidad en vertebrados. En dichos experimentos, cuando se trata un blastema de carácter distal con ácido retinoico (RA), ocurre una reprogramación de células distales hacia destinos más proximales, dando lugar a una duplicación en tándem del eje próximo-distal (Saxena y Niazi, 1977; Maden, 1983a, 1983b). Sin embargo, cuando dichos experimentos se habían intentado reproducir durante el desarrollo del embrión de pollo, no se obtuvieron duplicaciones en tándem (Mercader *et al.*, 2000). En lugar de iniciar un eje nuevo, microesferas cargadas con RA e insertadas en zonas distales de la extremidad, se movían – arrastradas por las células a su alrededor – hasta la articulación del codo, donde daban lugar a la formación de elementos esqueléticos ectópicos que se fusionaban con el elemento endógeno (húmero). Para evitar dicho inconveniente se decidió hacer los injertos en la zona anterior del romboencéfalo (Fig. R7, panel inferior derecho), donde era imposible que pudieran fusionarse con elementos endógenos de la extremidad. Así pues, se cortaron y transplantaron puntas distales de unas 200 micras de espesor y provenientes de donantes de estadios HH19-20, HH21-22 y HH24. Muy a menudo, cada experimento llevaba su control en paralelo, de modo que de los dos trasplantes obtenidos de un mismo donante, uno no llevaba tratamiento (o sólo tratamiento con DMSO), mientras que el otro se trataba con una

microesfera de RA (1 mg/ml) insertada muy superficialmente (Fig. R8a, flecha naranja, ver Materiales y Métodos).

Con donantes de estadio HH19-20, se apreció un efecto muy potente. Mientras los controles formaban como mucho zeugopodio y autopodio (Fig. R8b y c), los injertos tratados con RA formaron con gran frecuencia todo el eje P-D, incluyendo estructuras de la cadera ( $n=4/5$ , Figura R8b'), y en un caso se formó desde la mitad del estilopodio (Fig. R8c). Con donantes de estadio 21-22, mientras los controles formaban sistemáticamente autopodio, los tratados con RA formaron zeugopodios completos ( $n=3/6$ ) o incompletos ( $n=3/6$ , Figura R8c). Ninguno de los injertos de estadio HH24 mostró respuesta a RA ( $n=3$ , Figura R8c). Se concluyó por tanto que el experimento era adecuado como ensayo de reprogramación, así como que la capacidad de reprogramación de las células distales indiferenciadas disminuye con el tiempo de desarrollo.

#### IV.3.2 Evaluación del efecto de señales endógenas sobre el patrón próximo-distal de trasplantes de extremidad.

Una vez validado el experimento, quedaba comprobar si las señales endógenas eran capaces de provocar efectos similares a los observados con RA exógeno. Para ello, se transplantaron puntas distales de 200 micras a dos tipos de localizaciones: potencialmente proximalizantes (somitos y parte proximal del primordio de ala de HH20) y potencialmente no proximalizantes (futuro zeugopodio de HH24 y romboencéfalo anterior de HH19-21). La distinción, hecha *a priori*, se basó en las cantidades de RA endógeno descritas para esas regiones (mayor en las zonas potencialmente proximalizantes que en las no proximalizantes) (Rossant *et al.*, 1991; Maden *et al.*, 1998) y en nuestra propia comprobación de los niveles de señalización de RA (Fig. R7).



**Figura R7.** Señalización de RA en las distintas regiones utilizadas para los experimentos de trasplantes. Los paneles muestran hibridaciones *in situ* para RAR $\beta$ , un gen diana de RA (Hayamizu y Bryant, 1994). Las elipses muestran el sitio concreto de transplante (azul para ala proximal, verde para somitos, rojo para futuro zeugopodio y romboencéfalo anterior).

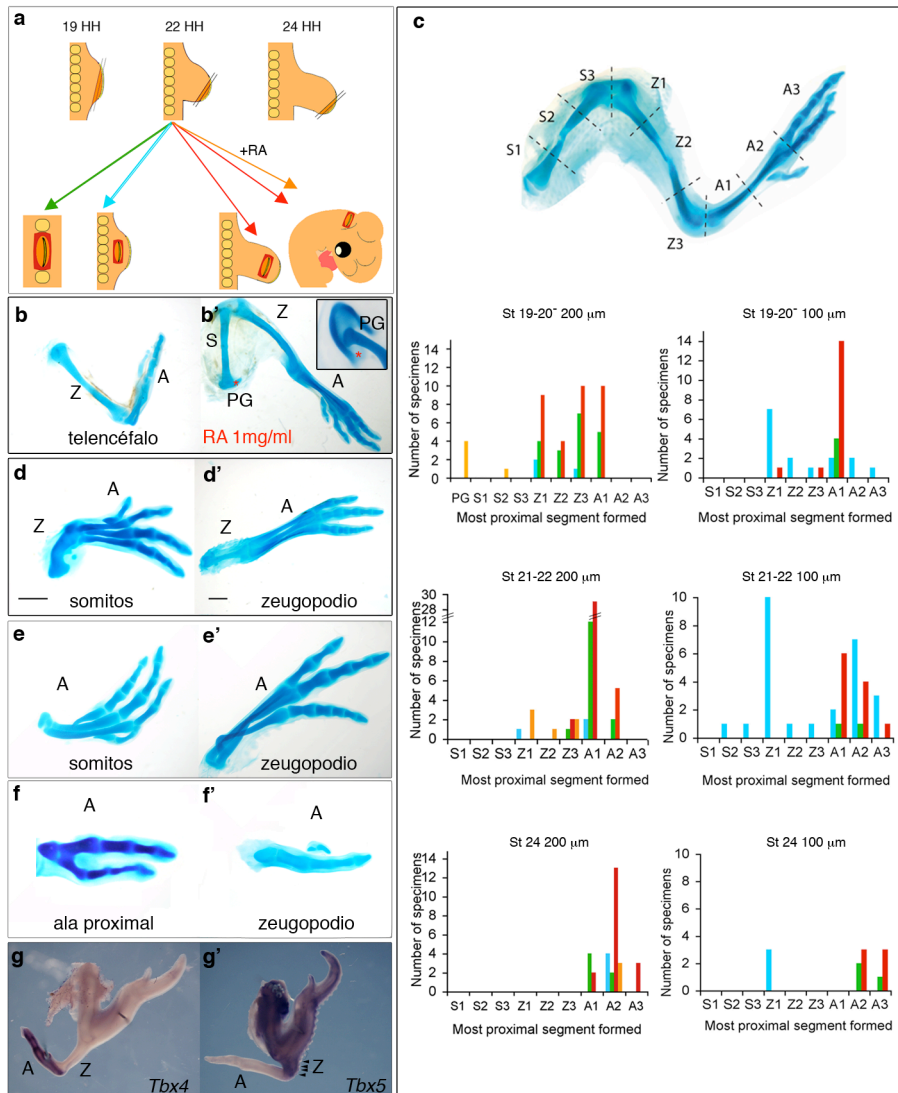
Para cuantificar el efecto del experimento, se dividió el eje P-D en 9 elementos, 3 por cada segmento (S1-S3, Z1-Z3, A1-A3), además de un décimo elemento correspondiente a la cadera (PG). A cada transplante se le asignó una u otra identidad de acuerdo al elemento más proximal que formó tras 6-7 días de desarrollo (ver Fig. R8c y ejemplos en Fig. R9)

La primera observación relevante es que los segmentos obtenidos correlacionaban bastante bien con el mapa de destinos de las regiones transplantadas (Saunders, 1948; Stark y Searls, 1973; Bowen *et al.*, 1989; Vargesson *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 2007). Es decir, que conforme más avanzados eran los donantes utilizados, más distales eran las estructuras a las que daban lugar (Fig. R8c). A este respecto, los trasplantes de estadio HH19-20 resultaron dar lugar a una mayor variabilidad que la de los otros estadios. Dicha variabilidad se debía muy probablemente a



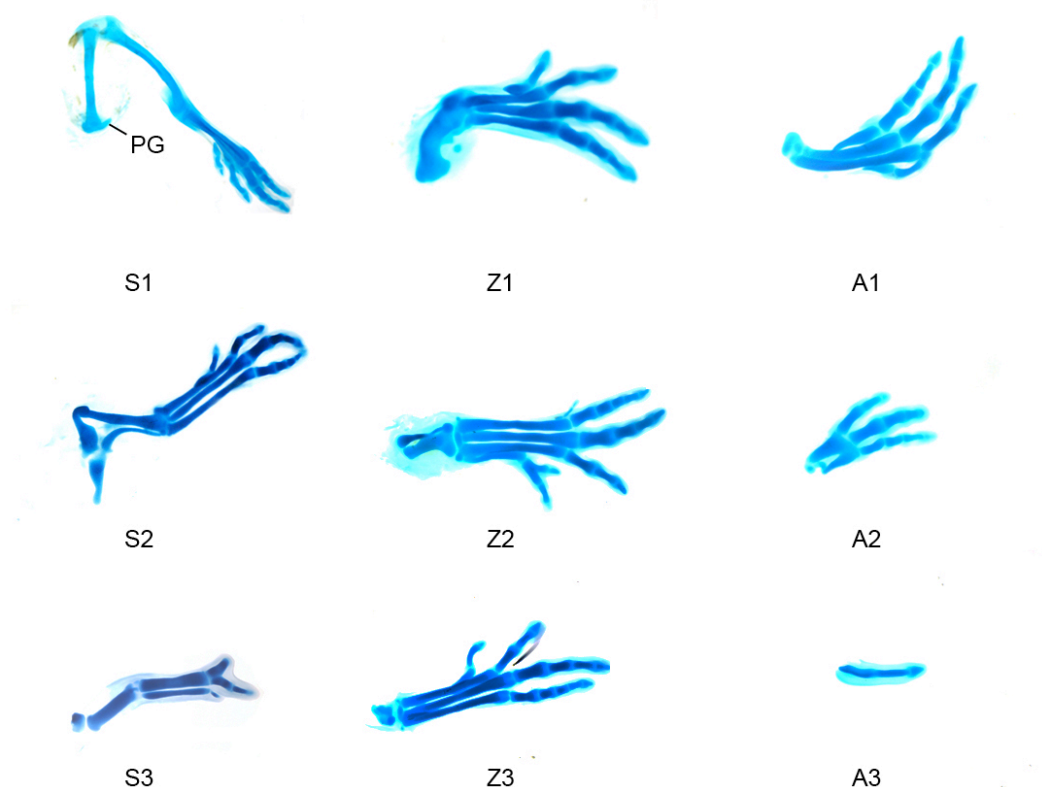
#### IV. RESULTADOS

que el primordio de extremidad es muy pequeño a esos estadios, de modo que cualquier error cometido al cortar la punta del primordio se veía más amplificado que si el mismo error se cometía en estadios más avanzados. En cualquier caso, se decidió hacer una comparación cuantitativa además de cualitativa, para poder aplicar criterios estadísticos. A cada uno de los posibles elementos se le asignó un valor numérico, de forma que a PG le correspondía el 0, a S1 el 1, a S2 el 2... y así sucesivamente hasta A3 = 9. De esta manera se calculó un valor medio y una desviación estándar para cada serie experimental, lo que permitía una comparación más estricta. Dichos datos, así como el valor más frecuente de cada serie, aparecen en la Tabla V.



**Figura R8.** Ensayo de reprogramación de células distales de la extremidad. **a**, Esquema del procedimiento. Los injertos marcados con flechas verde, azul y rojas sirven para evaluar el efecto de señales endógenas. La flecha naranja indica el injerto en romboencéfalo rostral tratando la región transplantada con RA. **b** y **b'**, Ejemplos representativos de transplantes al romboencéfalo rostral, provenientes de un mismo donante de estadio HH20. Mientras el injerto no tratado formó zeugopodio (Z) y autopodio (A), el tratado con una microesfera de RA formó también estilopodio (S) y una pequeña parte de cadera (PG). En el detalle se muestra otro espécimen que formó una parte más notable de cadera. Los asteriscos rojos marcan las microesferas. Ambas fotos están mostradas al

mismo aumento. **c**, Gráficas que contienen todos los datos de los transplantes de 200 (izquierda) y 100 micras (derecha). En la parte superior del panel aparece una extremidad subdividida de acuerdo al sistema de clasificación utilizado. El eje de abscisas representa el eje P-D subdividido de acuerdo a dicho sistema, mientras que el eje de ordenadas representa el número de especímenes correspondientes a cada categoría. El código de colores es el mismo que en **a**. **d** - **f**, Ejemplos del resultado obtenido con transplantes de 200 micras de estadios HH19 (**d** y **d'**), HH22 (**e** y **e'**) y HH24 (**f** y **f'**), tras injertarlos en localizaciones potencialmente proximalizantes (**d**, **e**, **f**, sitio indicado en la parte inferior), o no proximalizantes (**d'**, **e'**, **f'**, sitio indicado en la parte inferior). Cada pareja está mostrada al mismo aumento, salvo **d** y **d'**, donde las barras de escala representan 1 mm. **g** y **g'**, Ejemplos representativos de transplantes de 100 micras (donante HH19) injertados en ala proximal. La contribución donante-receptor fue evaluada mediante hibridación *in situ* de *Tbx4* (**g**, marcador de pata) y *Tbx5* (**g'**, marcador de ala). Las puntas de flecha en **g'** marcan los primordios de pluma.



**Figura R9.** Ejemplos de transplantes y su identidad asignada. En el caso de los huesos largos, la clasificación se basaba en la presencia, como elemento más proximal, de la epífisis proximal (S1 o Z1), de la diáfisis (S2 o Z2), o de la epífisis distal (S3 o Z3). En el caso del autopodio, la clasificación se basó en la presencia, como elemento más proximal, del tarso-metatarso completo (A1) o incompleto (A2), o sólo de las falanges (A3). Nótese que el espécimen clasificado como S1 formó también una pequeña parte de la cadera (PG), y que el espécimen clasificado como S3 es de ala y no de pata.

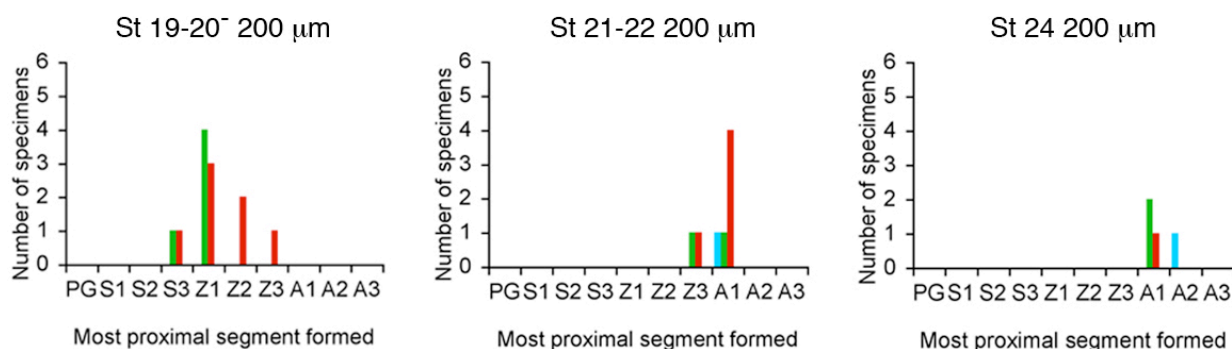
Estadio	Elemento	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Media	DesvEst	Moda
	Localización	PG	S1	S2	S3	Z1	Z2	Z3	A1	A2	A3			
19-20	ala proximal					2		1				4.67	1.15	Z1
	somitos		1			4	3	7	5			5.45	1.50	Z3
	zeug+romb		1			9	4	10	10			5.5	1.43	Z3-A1
	RA 1mg/ml	4		1								0.4	0.89	PG
21-22	ala proximal					1			2			6.0	1.73	A1
	somitos							1	12	2		7.07	0.45	A1
	zeug+romb							2	29	5		7.08	0.44	A1
	RA 1mg/ml					3	1	2				4.83	0.98	Z1
24	ala proximal									4		8.0	0	A2
	somitos								4	2		7.33	0.52	A1
	zeug+romb								2	13	3	8.06	0.57	A2
	RA 1mg/ml									3		8.0	0	A2

**Tabla V.** Clasificación de todos los transplantes de 200 micras de acuerdo al estadio del donante, la localización del transplante y al elemento más proximal formado. También se muestran las medias, desviaciones estándar y modas correspondientes a cada serie. Los valores S1 obtenidos con un espécimen de HH19-20 injertado en somitos y otro injertado en futuro zeugopodio (marcados en rojo) fueron analizados mediante el test de Grubbs para detectar *outliers*, usando la herramienta *Graphpad* disponible en la página web <http://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>. Ambos resultaron ser *outliers* usando un nivel de significancia de 0.05, por lo que se eliminaron a la hora de incluirlos en las gráficas de la Figura R8c. En el resto de series de datos no se encontró ningún *outlier*.

#### IV. RESULTADOS

En cuanto a la comparación entre los resultados obtenidos transplantando en las diferentes localizaciones, se realizó mediante una prueba t de Student no pareada. Para poder realizar este tipo de prueba estadística, el tamaño de muestra debe ser grande y su distribución normal. Así pues, la serie “ala proximal” no fue incluida en la evaluación estadística, dado el bajo número de especímenes disponible. Se comparó por tanto la serie “somitos” con la de “zeugopodio + romboencéfalo”. No obstante, el número de especímenes de HH24 injertados en somitos era demasiado bajo para hacer un test de normalidad fiable, y la distribución de los trasplantes de HH19-20 a somitos no cumplía el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov (calculado en la página [http://www.physics.csbsju.edu/stats/KS-test.n.plot\\_form.html](http://www.physics.csbsju.edu/stats/KS-test.n.plot_form.html)). Por tanto, los únicos resultados con gran poder estadístico serían los obtenidos con trasplantes de HH22, aunque se calcularon también para las otras dos series de datos.

En el caso de donantes de HH19-20, el valor p obtenido fue 0.8871, para HH21-22 fue 0.9034 y para HH24 fue 0.0089. Es decir, no se encontraron diferencias significativas para trasplantes de HH19-22, y aunque sí lo eran para los de HH24, el cambio consistía sólo en un subelemento (A1 para somitos, A2 para zeugopodio + romboencéfalo). La conclusión del experimento fue por tanto que las señales endógenas no afectaban en gran medida el desarrollo de los trasplantes. Como control adicional, se comprobó que el origen pata/ala del trasplante tampoco influía su capacidad para ser reprogramado (Fig. R10).



**Figura R10.** Gráficas resumiendo los resultados de transplantar puntas distales de ala (200 micras) a diferentes localizaciones del embrión. Aunque el número de especímenes analizado es menor que en el caso de los trasplantes de pata, de nuevo no parece haber grandes diferencias al transplantar a diferentes localizaciones. Nótese no obstante que el resultado medio obtenido para cada estadio es algo más proximal que el obtenido en los correspondientes trasplantes de pata, lo que muy probablemente refleja la heterocronía existente entre la extremidad superior y la inferior.

No obstante, existía la posibilidad de que la señal proximal, en el caso de existir, sólo pudiera difundir una pequeña distancia. Además, algunas evidencias de la literatura sugerían que el tamaño del injerto podía tener influencia en su capacidad de regulación (Zwilling, 1956; Summerbell, 1977a). Por tanto, se decidió repetir el experimento, pero esta vez cogiendo sólo 100 en lugar de 200 micras. En este caso, con alta frecuencia se obtenía que los trasplantes a ala proximal (no así a somitos) formaban elementos de carácter más proximal que los que formaban los injertados en cabeza o zeugopodio (Fig. R8c). Es destacable que los casos en que no se observaba ese efecto eran aquellos injertos que habían prendido más superficialmente. Estos resultados parecían ser una evidencia de regulación o reprogramación, aunque el hecho de que no ocurriera al transplantar a somitos, así como la presencia de primordios de pluma en elementos que parecían zeugopodio (característica de ala, puntas de flecha en Fig. R8g'), llevaba a pensar que tal vez el tejido de la extremidad receptora estaba siendo reclutado para formar parte de la nueva estructura. Efectivamente, al comprobar la contribución de donante y receptor mediante el análisis de expresión de *Tbx4* y *Tbx5*, se vio que la estructura que surgía al nivel del codo del receptor era de carácter híbrido, con la parte proximal proveniente del receptor, y la distal proveniente del donante (Fig. R8g y g'). Este reclutamiento podría explicar



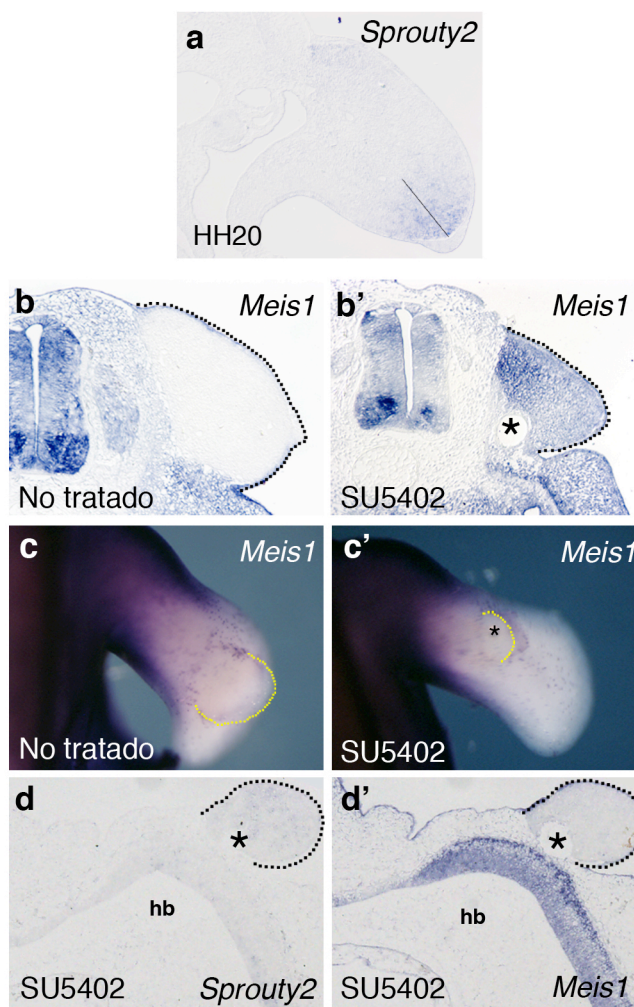
algunos resultados clásicos de regulación en los que no se había analizado el origen del tejido de nueva formación (Kieny, 1964a; Summerbell, 1977a). Por tanto, la conclusión era de nuevo que no se encontraban diferencias al transplantar a diferentes entornos moleculares.

Otras pruebas que se hicieron para intentar facilitar la reprogramación de los trasplantes tampoco dieron resultado (Fig. S4 en el Material Suplementario), por lo que quedaba clara la imposibilidad de reprogramación en estas condiciones.

No obstante, al analizarlo con detenimiento, se detectó una limitación importante en el experimento. Para un ensayo de reprogramación es necesario utilizar las células indiferenciadas de la extremidad, las que están bajo la influencia del AER (Tabin y Wolpert, 2007; ten Berge *et al.*, 2008), ya que probablemente son las que tienen un estado de especificación más lábil. Son justamente esas células las que mayor señalización de FGF reciben, como se puede apreciar por la expresión del gen diana *Sprouty2* (Minowada *et al.*, 1999) (Fig. R11a). Dado que se ha descrito que la señalización de FGF es capaz de bloquear las señales proximales (Mercader *et al.*, 2000; Mariani *et al.*, 2008), lo más probable era que aunque los trasplantes a somitos y a ala proximal estuvieran recibiendo una señal proximalizante, su efecto no pudiera ser apreciado porque era contrarrestado por la señalización de FGF. Para comprobar esta hipótesis, se repitió de nuevo el experimento de trasplante a somitos, pero en esta ocasión, un injerto de cada pareja se trató con microesferas cargadas en el inhibidor de FGFR1 SU5402 (Mohammadi *et al.*, 1997). Desafortunadamente, los trasplantes tratados con este inhibidor no crecieron adecuadamente, por lo que no pudo analizarse el patrón esquelético. No obstante, sí que se analizó la expresión de marcadores 21-22 horas tras el trasplante (htt). Así, mientras que los trasplantes de HH19-20 no expresaban *Meis1*, marcador de estilopodio y gen diana de RA (Mercader *et al.*, 1999; 2000; 2005; 2009) (Fig. R11b), los tratados con el inhibidor de FGFR1 activaron *Meis1* en todo el mesénquima (Fig. R11b'). Resulta interesante que si los trasplantes (tanto tratados con el inhibidor como no tratados) se injertaban en futuro zeugopodio (Fig. R11c y c') o en romboencéfalo anterior (Fig. R11d'), no activaban *Meis1*, lo que sugiere que para dicha activación de *Meis1* no basta con inhibir la señalización de FGF (Fig. R11d), sino que además debe haber cerca una fuente de señal proximal.

**Figura R11 (página siguiente).** La inhibición de la señalización FGF en el trasplante permite que éste responda a señales proximales. **a**, Extensión del dominio *Sprouty2* (señalización FGF) en un primordio de extremidad de HH20. La línea negra representa 200 micras. **b** y **b'**, Comparación de la expresión de *Meis1* entre trasplantes injertados sin tratamiento (**b**) o con dos microesferas de SU5402, a 2.5 mg/ml (**b'**), 22 horas tras el trasplante a somitos. n=2 controles, 4 experimentales (primordios de pata); 2 controles, 3 experimentales (primordios de ala). **c** y **c'**, Igual que en **b** y **b'**, pero transplantando a futuro zeugopodio, n=2 controles, 2 experimentales. **d** y **d'**, Expresión de *Sprouty2* (**d**) y *Meis1* (**d'**) en secciones adyacentes de un trasplante injertado en romboencéfalo anterior y tratado con SU5402, 22 horas tras la operación. hb= romboencéfalo.

Los asteriscos marcan las microesferas. Las líneas punteadas delimitan los injertos.



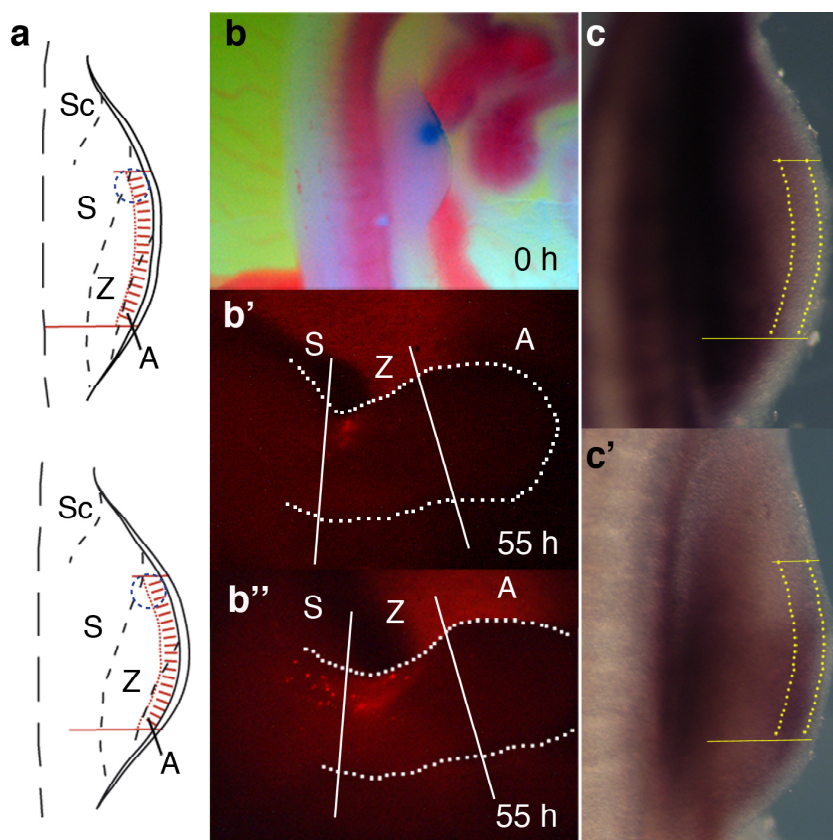
### IV.3.3 Uso de extremidades recombinantes para evaluar el efecto de señales endógenas en la formación de patrón próximo-distal.

Los experimentos anteriores indicaban que para ver reprogramación por señales proximales era necesario sacar las células distales indiferenciadas de su entorno de alta señalización de FGF, pero sin usar un inhibidor que comprometiera el crecimiento del trasplante. Para ello, se decidió hacer uso de una variante del modelo de extremidades recombinantes (Zwilling, 1964; Ros *et al.*, 1994). En esta variante, en lugar de disociar todo el mesénquima de la extremidad para rellenar un nuevo ectodermo y generar una extremidad artificial, sólo las células pertenecientes a las 100 micras más distales del primordio de ala son utilizadas (Dudley *et al.*, 2002) (ver protocolo detallado en Materiales y Métodos). De esta manera, se genera una extremidad recombinante (de unas 500 micras de longitud en el eje P-D) que está constituida exclusivamente por células distales, pero en la que muchas de esas células quedan más allá de la influencia de las señales del AER, pudiendo en teoría responder a señales endógenas presentes en el sitio de injerto. Además, había evidencias de que este tipo de recombinantes (con mesénquima distal de HH20), cuando se transplantaban a los somitos, podían formar los 3 segmentos del eje P-D (Dudley *et al.*, 2002), lo que los revelaba como un sistema muy prometedor para el estudio que se quería llevar a cabo.

Antes de realizar los experimentos, era importante conocer el destino y el estado de especificación de las células que se iban a usar para generar los recombinantes. De forma consistente con los mapas de destino publicados para HH19-20 (Saunders, 1948; Vargesson *et al.*, 1997), la región utilizada contenía gran parte de los progenitores de autopodio, así como los

de la parte anterior del zeugopodio, y quizá una pequeña proporción de precursores de estilopodio (Fig. R12a). Se realizó una comprobación adicional, marcando *in ovo* con el colorante lipofílico Dil la zona más anterior (y por tanto la más proximal) de esa región (Fig. R12a, círculos azules, R12b y b'). Como era de esperar, tras dos días de desarrollo, el grueso de la marca se encontró en la parte anterior del zeugopodio (Fig. R12b'), aunque la mitad de los especímenes analizados tenían también marca en algunas células dispersas del estilopodio (Fig. R12b'', n=6). Además, se analizó en detalle la expresión de *Meis1* (marcador de estilopodio) y *Hoxa11* (marcador de zeugopodio) en primordios de extremidad del estadio utilizado para el experimento. La región utilizada para formar los recombinantes expresaba *Hoxa11* pero no *Meis1* (Fig. R12c y c'). Juntando ambas evidencias se concluyó por tanto que se estaban cogiendo principalmente precursores de zeugopodio y autopodio, que ya no expresaban *Meis1*.

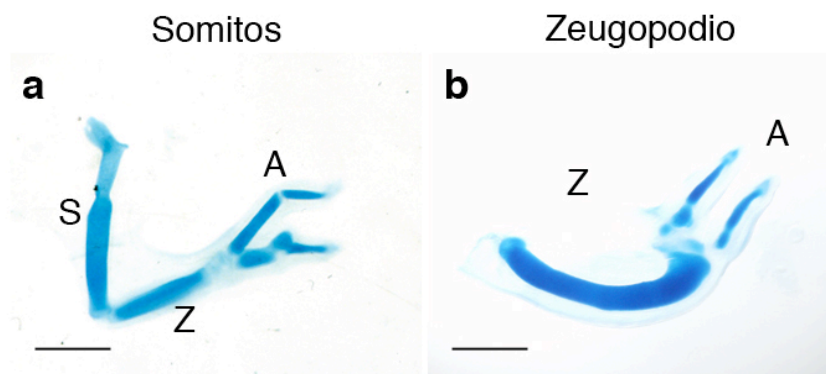
Se procedió entonces a comparar el resultado de transplantar extremidades recombinantes a los somitos de embriones HH20 (región potencialmente enriquecida en la supuesta señal proximal) o al futuro zeugopodio de embriones HH24 (con niveles mucho más bajos de esa señal proximal). Como ya se había publicado, tras 6 días de desarrollo los recombinantes injertados en somitos (sRLs) formaron un eje P-D completo, con estilopodio, zeugopodio y autopodio (n= 8, Figura R13a)\*. Sin embargo, los injertados en zeugopodio (zRLs) formaron sólo 2 elementos, que se identificaron como zeugopodio y autopodio (n=6, Figura R13b).



**Figura R12.** Destino y estado de especificación molecular de las células utilizadas para formar las extremidades recombinantes. **a**, Mapa de destinos del primordio de extremidad en HH19 (arriba) y 20 (abajo), basados en la literatura. Los precursores de escápula (Sc), estilopodio (S), zeugopodio (Z) y autopodio (A) aparecen separados por líneas discontinuas. La zona rayada, delimitada por líneas continuas y punteadas rojas, representa la región utilizada para formar los recombinantes. Los círculos azules marcan la posición y tamaño aproximados de la inyección de Dil en los experimentos de marcaje. **b - b''**, Trazado de linaje de la zona proximal-anterior usada para el experimento de recombinantes. Tras el marcaje *in ovo* (**b**), la marca fluorescente fue examinada a las 55 horas (**b'** y **b''**). La línea punteada delimita la extremidad, mientras que las

líneas continuas marcan los límites entre estilopodio (S) y zeugopodio (Z) y entre zeugopodio y autopodio (A). **c y c'**, Un mismo embrión de estadio HH20 temprano fue cortado sagitalmente, y una mitad fue hibridada para *Meis1* (**c**) y la otra para *Hoxa11* (**c'**, la imagen está invertida horizontalmente para facilitar la comparación). Se muestran los primordios de ala. Las líneas continuas y punteadas amarillas delimitan la región de interés. Nótese cómo la expresión de *Meis1* no está presente en dicha región.

\* A veces sRLs y zRLs se truncaban prematuramente, debido probablemente a una mala recombinación AER-mesénquima. Los especímenes truncados sólo se incluyeron en el recuento si la identidad de los elementos presentes estaba clara (por ejemplo dos elementos largos uno a continuación del otro), o si se analizaron molecularmente para comprobar su identidad (ver Figura R17).



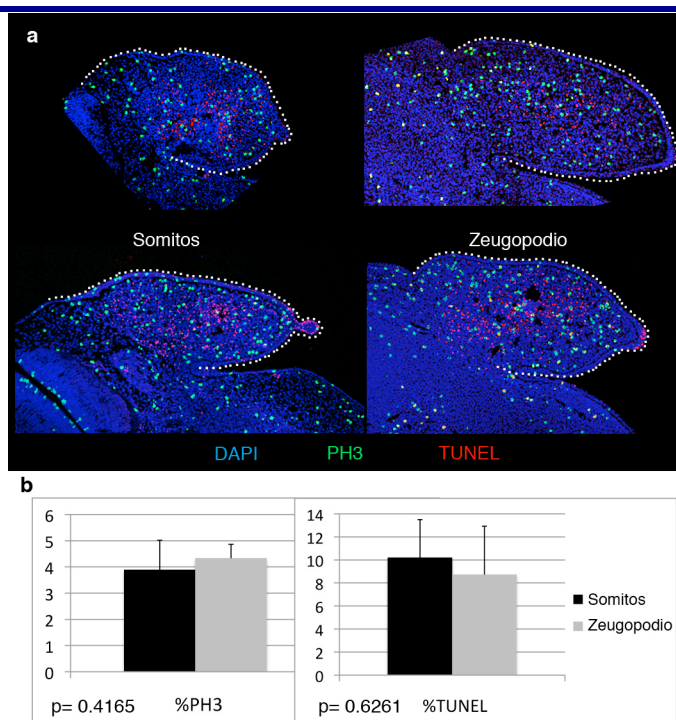
**Figura R13.** Extremidades recombinantes hechas de células distales (RLs) alteran su identidad próximo-distal en respuesta al lugar de trasplante. **a** y **b**, Ejemplos representativos de extremidades recombinantes (RLs) transplantadas a somitos (**a**) y futuro zeugopodio (**b**), 6 días tras la operación. Barras de escala = 1 mm. S= estilopodio, Z= zeugopodio, A= autopodio.

Puesto que la única diferencia radicaba en el sitio de injerto, estos resultados sugerían que los recombinantes eran capaces de responder al entorno local, alterando su secuencia P-D.

No obstante, para poder afirmar que lo que ocurría era una reprogramación de identidad, debía comprobarse que sRLs y zRLs no mostraban distinta distribución de muerte o proliferación celular. De hecho, un incremento de apoptosis y/o una disminución de proliferación específicos de la zona proximal podrían explicar la ausencia del estilopodio en los zRLs. Por tanto, se analizó la distribución de células positivas para TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick-end labelling*, marcador de apoptosis) y fosfohistona 3 (PH3, marcador de células en división), 20 htp. No se encontraron diferencias en dicha distribución (Fig. R14a). Además, se cuantificó el nivel total de ambos parámetros (relación entre el número de células marcadas y el número de núcleos). La varianza de ambas poblaciones (sRLs y zRLs) para cada experimento no resultó ser significativamente distinta de acuerdo al test F de dos colas (realizado en la página de *Graphpad*), lo que permitió comparar ambas poblaciones mediante una prueba t de Student no pareada (Fig. R14b, n=3 especímenes, 13 secciones de sRLs y n=5 especímenes, 29 secciones de zRLs). No se encontraron diferencias significativas que pudieran justificar la formación de un distinto número de elementos en sRLs y zRLs.

**Figura R14 (página siguiente).** Los procesos de muerte y proliferación celular no varían entre sRLs y zRLs. **a**, Secciones confocales representativas de recombinantes fijados 20 horas tras el trasplante, teñidas con DAPI (azul), fosfohistona3 (verde) y TUNEL (rojo). A la izquierda se muestran dos ejemplos de sRLs y a la derecha dos de zRLs. Los ejemplos de la parte superior son representativos de los niveles más bajos de muerte encontrados en los recombinantes, y los de la parte inferior son muestras representativas de los niveles más altos. Las líneas punteadas perfilan los recombinantes. **b**, Gráficas de proliferación (izquierda) y muerte (derecha) de sRLs (negro) y zRLs (gris). Los datos se muestran como media del número de células positivas para una u otra tinción por cada 100 núcleos, más su desviación estándar (barras de error). Sólo la región perteneciente al trasplante fue cuantificada. El valor p de la prueba t de Student no pareada se muestra en la esquina inferior izquierda de cada gráfica.

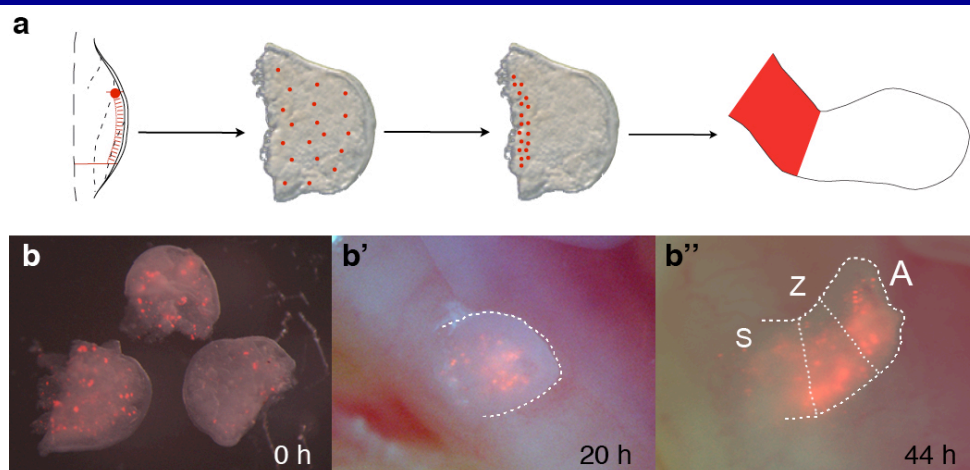




Otro control importante consistía en comprobar si se estaba utilizando una mezcla heterogénea de poblaciones celulares en cuanto a propiedades de adhesión. Se ha descrito que tan temprano como HH19, las células proximales y distales del primordio de extremidad son capaces de distinguirse por sus propiedades de adhesión, de modo que cuando se cultivan en ciertas condiciones, las células proximales se agrupan entre sí, excluyendo a las distales, y viceversa (Barna y Niswander, 2007). Así pues, dado que en el experimento de recombinantes se podía estar cogiendo una pequeña población de células de carácter proximal además de una mayoría de carácter distal (Fig. R12b''), existía la posibilidad de que dichas células de carácter proximal pudieran moverse activamente hacia la región proximal. Si además, al injertarlas en somitos, esas células se expandían preferencialmente, podrían dar lugar a la formación del estilopodio sin necesidad de invocar una reprogramación de identidad de las células distales (Fig. R15a). Pese a que los datos de proliferación no parecían apoyar esta posibilidad (Fig. R14a), se decidió comprobarla mediante un nuevo experimento de marcaje.

Se volvió a marcar *in ovo*, con Dil, la zona más anterior de la región usada para hacer los recombinantes, de forma que tras la disociación y reagregación, la marca fluorescente estaba distribuida de manera homogénea (Fig. R15b). Tras ser transplantados a los somitos, los recombinantes seguían mostrando una distribución homogénea de la marca fluorescente en el eje P-D, tanto a las 20 (Fig. R15b') como a las 44 horas (Fig. R15b''). Esto descartaba que estuviera operando un mecanismo de reorganización celular y expansión preferencial de las células proximales. En definitiva, todas las evidencias apuntaban a un fenómeno de reprogramación durante el proceso de formación de patrón de los sRLs.

#### IV. RESULTADOS



**Figura R15.** No se produce movimiento relativo de una población particular de células en el seno del recombinate. **a**, Hipótesis que se quería descartar. Si se estuviera cogiendo una minoría de células con carácter proximal (círculo rojo, primer panel), capaces de separarse de las demás, se podría pasar de una distribución inicialmente homogénea (segundo panel) a una reorganizada en la que dichas células estuvieran agrupadas en proximal (tercer panel). Si al injertarlas en somitos dichas células proximales se expandieran más que el resto, podrían dar lugar a la formación de un estilopodio (cuarto panel) sin que haya mediado un mecanismo de reprogramación de las células no proximales. **b – b''**, Para comprobarlo, se marcó esa región con DiI, de forma que tras el proceso de preparación del recombinate, la marca fluorescente estaba distribuida homogéneamente (**b**). Tras injertarlo en somitos, dicha distribución permaneció homogénea en el eje P-D tanto a las 20 (**b'**) como a las 44 horas (**b''**) tras el transplante (n=3). Las líneas punteadas perfilan el recombinate y muestran la separación entre los futuros segmentos de la extremidad, estilopodio (S), zeugopodio (Z) y autopodio (A).

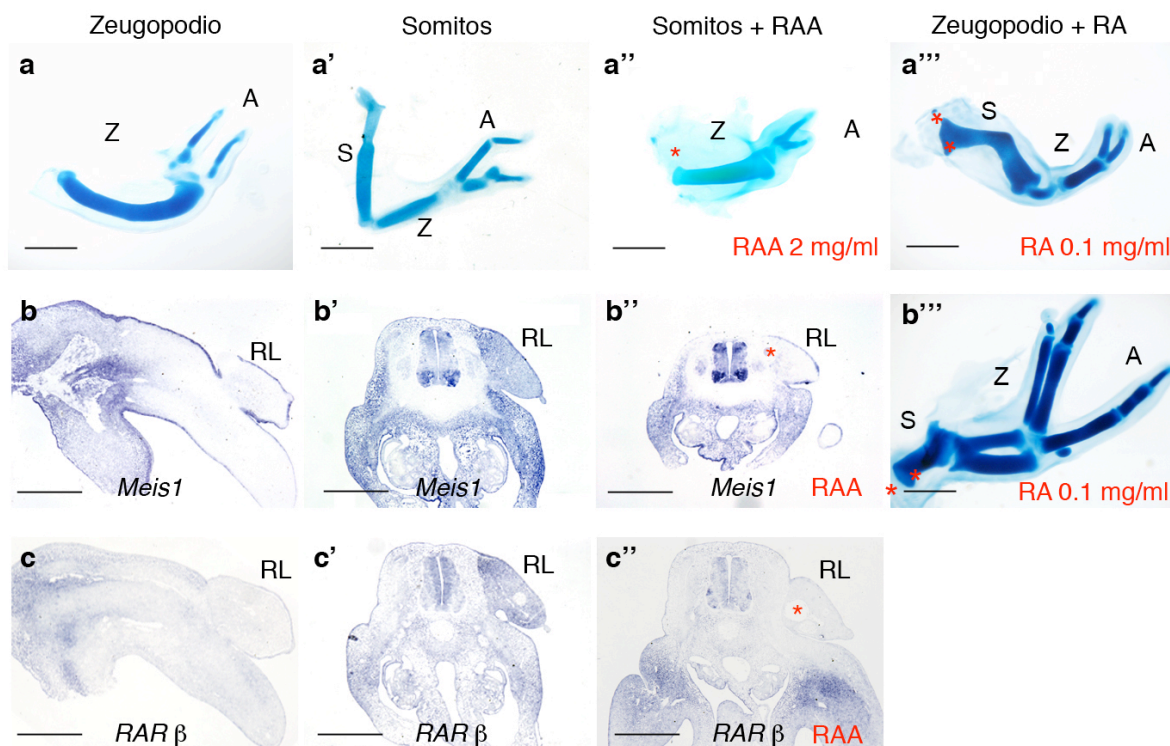
Una vez confirmado que estaba teniendo lugar una reprogramación de identidad al injertar los recombinantes en somitos, pero no al injertarlos en zeugopodio, quedaba averiguar cuál era el papel que las señales endógenas estaban jugando en dicho proceso. Así, al analizar los niveles de señalización de RA en los sRLs y zRLs, se comprobó que tras 20-30 horas, los sRLs expresaban *Meis1* (n=11) y *RARβ* (n=2) en una región considerable del eje P-D (Fig. R16b' y c'), mientras que la mayor parte de los zRLs no mostraban niveles de expresión apreciables de *Meis1* (n=8/10) ni de *RARβ* (n=2) a lo largo del eje P-D (Fig. R16b y c).

Para comprobar si dicha correlación era la causa del fenotipo observado, se procedió a bloquear la señalización de RA en los sRLs. Antes de injertarlos, se les insertaron microesferas impregnadas con antagonistas de los receptores de RA (RAA): BMS493 (Germain *et al.*, 2002; Geissmann *et al.*, 2003) o AGN193109 (Klein *et al.*, 1996) (los experimentos con este último los hizo la profesora Marian Ros, no el doctorando). En este caso, en lugar del eje completo, los sRLs formaron sólo 2 elementos, identificados como zeugopodio y autopodio (Fig. R16a'', n=5). De nuevo, la ausencia de estilopodio a los 6 días de desarrollo coincidía con la falta de expresión de *Meis1* (n=8) y *RARβ* (n=2) tras 20-30 horas de tratamiento (Fig. R16b'' y c'').

Una última pregunta que quedaba por responder era si el hecho de que los recombinantes no formaran estilopodio al ser transplantados en zeugopodio se debía a que no recibían suficiente RA o porque había alguna otra señal que inhibía la formación de dicho elemento. Para averiguarlo, se insertaron microesferas impregnadas en RA (0.1 mg/ml) en algunos RLs que luego se transplantaron a futuro zeugopodio. Tras seis días de desarrollo, 2 RLs resultaron muy afectados por el tratamiento, no pudiendo reconocerse los elementos formados, pero otros dos se desarrollaron bien, formando en ambos casos un estilopodio completo (Fig. R16a'' y b''').



De estos experimentos se podía concluir que el RA endógeno es necesario para la inducción de *Meis1* y la formación del estilopodio en los sRLs, y que el RA exógeno es suficiente para inducir la formación del estilopodio en los zRLs.



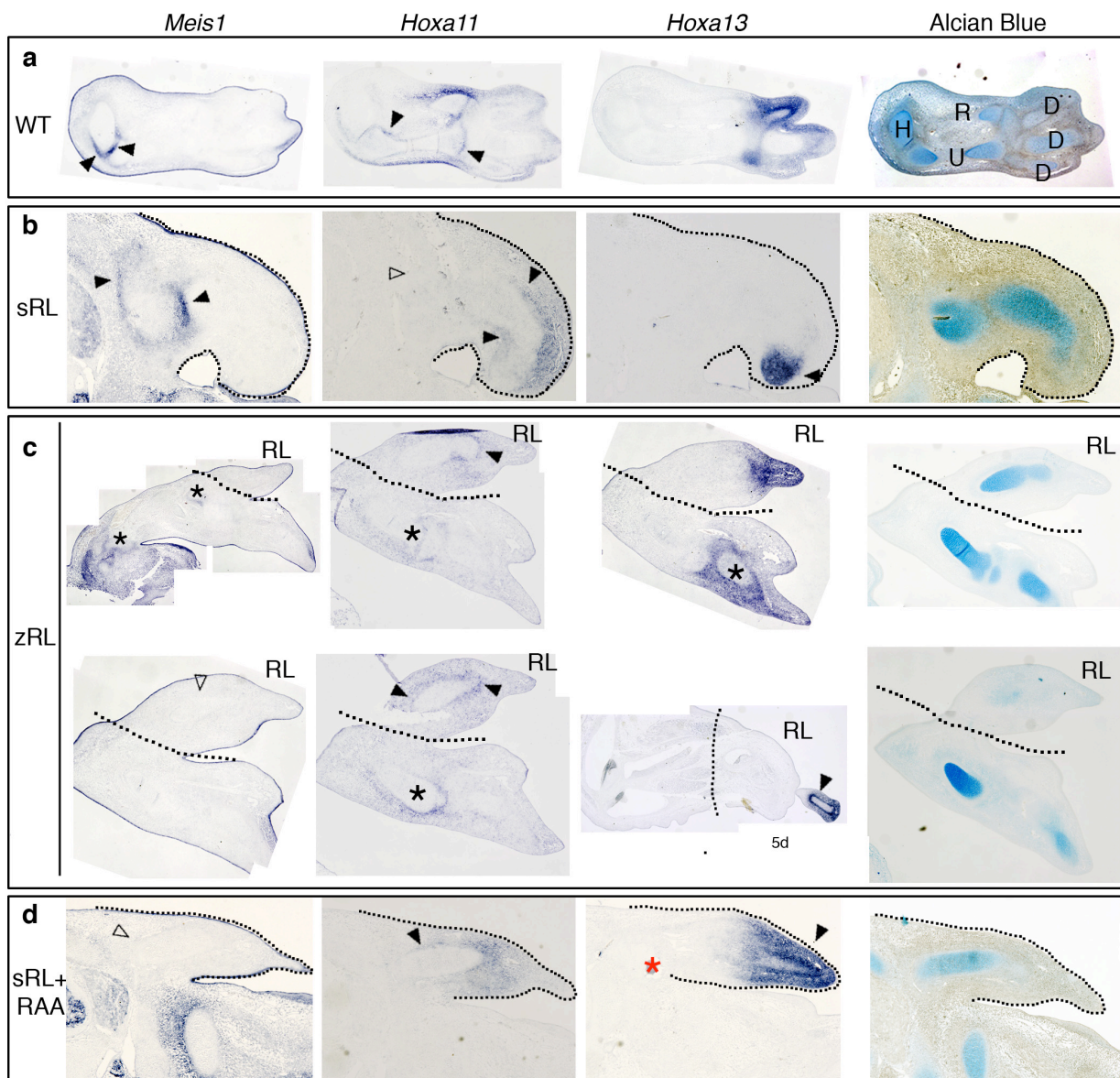
**Figura R16.** RA es necesario y suficiente para la formación del estilopodio en los recombinantes. **a – c''**, Ejemplos de extremidades recombinantes transplantadas a la región y con el tratamiento indicado en la parte superior. Las RLs se muestran 6 días (**a – a'''** y **b''**, barras de escala= 1mm) ó 20-30 horas (**b – b''** y **c – c''**, barras de escala= 500 micras) tras la operación.

S= estilopodio, Z= zeugopodio, A= autopodio. Los asteriscos rojos marcan la posición de microesferas cargadas con RA, o con antagonista de RA (RAA), según se indica.

Una limitación importante de estos experimentos era la posibilidad de que los elementos P-D producidos por las RLs no se correspondieran con el conjunto de elementos producido en una extremidad normal. Así, para la identificación de los elementos formados tras las diversas manipulaciones, se utilizaron criterios morfológicos cuando era posible (si el elemento más proximal se parecía a un radio, se asumía que se estaba formando zeugopodio), pero en muchos casos, dado que el elemento tenía una forma distorsionada, el único criterio pasaba a ser el número de elementos formados. Para resolver de manera definitiva esta limitación, se analizó si los elementos esqueléticos en proceso de diferenciación poseían algún código molecular que permitiera asignarles una identidad inequívoca. La expresión de marcadores moleculares como *Hoxa13*, *Hoxa11* y otros genes Hox ya había sido descrita en torno a los elementos esqueléticos de extremidades inferiores de pollo de estadio HH28 (Suzuki y Kuroiwa, 2002) y en extremidades de ratón de E14.5 (Perez *et al.*, 2010), así que se comprobó si mantenían esa regionalización en extremidades superiores de estadio HH31. Se encontró que el tejido rodeando al húmero expresaba de manera específica *Meis1* pero no *Hoxa11* ni *Hoxa13*, mientras que el tejido que rodeaba el radio y el cúbito expresaba específicamente *Hoxa11* (también expresado por el músculo), y el tejido que rodeaba las condensaciones del autopodio expresaba específicamente *Hoxa13* (Fig. R17a). Es decir, los elementos esqueléticos heredan el código molecular que sus precursores expresaron durante los estadios de primordio de extremidad. Este análisis permitía identificar sin ambigüedad los elementos formados por los recombinantes, así que se utilizó para tal fin.

#### IV. RESULTADOS

Se comprobó que los elementos de los sRLs conservaban el código que se veía en extremidades normales (el elemento más proximal expresaba *Meis1*, el intermedio *Hoxa11* y el distal *Hoxa13* - Figura R17b), lo que validaba las extremidades recombinantes como modelo para estudiar la especificación del patrón P-D. Además, el elemento más proximal de los sRLs expresaba *Meis1* pero no *Hoxa11*, indicando que se trataba de un estilopodio, mientras que el elemento más proximal formado por sRLs tratados con RAA y zRLs expresaba *Hoxa11* pero no *Meis1*, confirmando, como se sospechaba, su identidad de zeugopodio (Fig. R17c y d).



**Figura R17.** La expresión regionalizada de marcadores P-D permite asignar una identidad inequívoca a los elementos esqueléticos de los recombinantes. **a - d**, Imágenes compuestas (**a** y **c**) o simples (**b** y **d**) de secciones vecinas de varios recombinantes (RL) en las que se analizó la expresión de *Meis1*, *Hoxa11* o *Hoxa13* mediante hibridación *in situ*, así como el patrón de cartilago tiñéndolas con Alcian Blue, según se indica. Las puntas de flecha rellenas indican expresión, mientras que las vacías indican ausencia de expresión. En las imágenes en las que aparece un recombinante, los asteriscos negros indican expresión en algún elemento esquelético del receptor del transplante. El asterisco rojo marca la posición de una microesfera impregnada con RAA. Las líneas punteadas negras marcan el límite entre el RL y el tejido del receptor (zRL) o delimitan el contorno del RL (sRL y sRL+RAA). Todos los recombinantes se analizaron a los 3 días de ser transplantados, salvo el marcado como 5d, que se analizó a los 5 días para dar tiempo a que *Hoxa13* se restringiera al tejido que rodea las condensaciones.

Una vez validado el modelo y confirmado que estaba teniendo lugar un proceso de reprogramación, se decidió analizar la dinámica de expresión de marcadores P-D en los recombinantes injertados en ambas localizaciones, y en sRLs en que se manipularon las vías de señalización de RA y FGF. De nuevo, se hizo uso de *Meis1*, *Hoxa11* y *Hoxa13* como marcadores que indican una progresión en la especificación desde proximal hacia distal. Además, *Sprouty2* se usó como indicador de los niveles de señalización de FGF, y *Meis1* sirvió también como indicador de los niveles de señalización de RA. Los resultados se han resumido en el esquema de la Figura R18D.

8 htt, tanto sRLs como zRLs parecían expresar *Meis1* en casi todo el eje P-D, aunque más débilmente en la parte más distal, en un patrón complementario al de *Sprouty2* (Fig. R18Aa, b, a' y b'). Sin embargo, sólo los zRLs parecían expresar *Hoxa11*, que estaba restringido a la parte más distal (Fig. R18Aa'' y b''). En cuanto a la manipulación de señales en los sRLs, los resultados no fueron muy concluyentes. Si bien en algunos casos la aplicación de microesferas cargadas con RAA (2.5 mg/ml) inhibía sensiblemente la expresión de *Meis1* (Fig. R18Ac), en otros casos no parecía afectarla mucho (Fig. R18Ae). Las microesferas cargadas con FGF4 (0.3 mg/ml), solas o en combinación con las de RAA, no resultaron eficaces para inhibir la expresión de *Meis1* (Fig. R18Ad y e), aunque quizá sí para inducir una ligerísima activación generalizada de *Hoxa11* (Fig. R18Ad'' y e''), que no se producía al tratar sólo con RAA (Fig. R18c''). No se encontró expresión de *Hoxa13* en ninguna de las condiciones analizadas (no mostrado). La relevancia de estos resultados a tan poco tiempo tras la operación, así como los posibles problemas técnicos que podían estar ocurriendo, se discutirán más adelante (ver apartado VII.7.2).

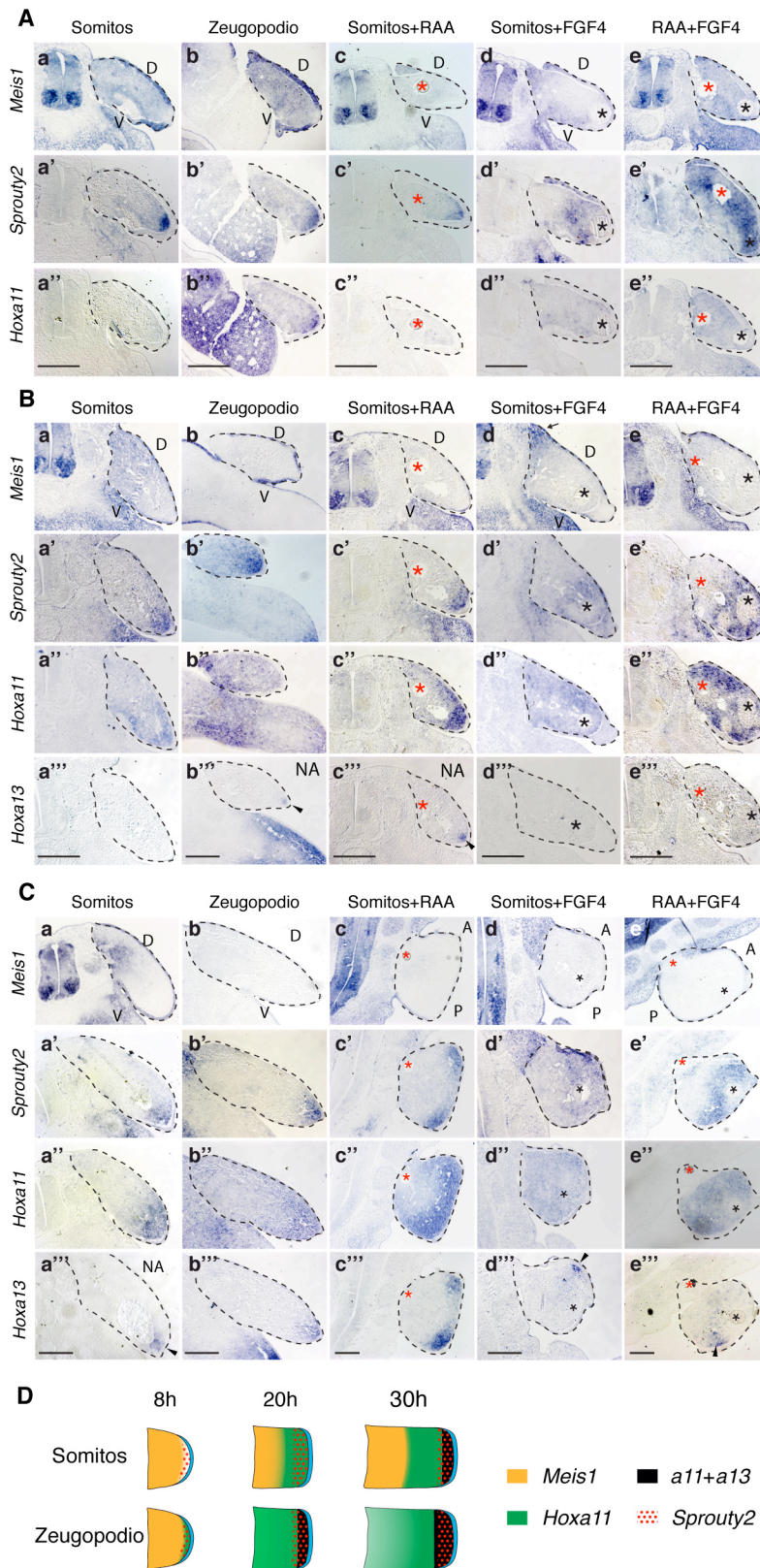
20 htt, como ya se ha comentado (Fig. R16), los sRLs expresaban *Meis1* a lo largo de gran parte del eje P-D, sin que llegara a haber una zona totalmente negativa, sino más bien un gradiente de expresión que se hacía más débil hacia el dominio de expresión de *Sprouty2* (Fig. R18Ba y a'). La mayoría de los zRLs, por su parte, no tenían un dominio perceptible de expresión de *Meis1* (Fig. R18Bb), mientras que la extensión del de *Sprouty2* era muy similar al de los sRLs (Fig. R18Bb'). El tratamiento con RAA o FGF4 eliminaba la expresión de *Meis1* (Fig. R18Bc y d), indicando su completa dependencia de las señales P-D a las 20 htt. La expresión de *Hoxa11* en sRLs resultó ser complementaria a la de *Meis1*, ocupando principalmente la zona distal y difuminándose hacia la proximal (Fig. R18a''), mientras que en los zRLs ocupaba todo el eje P-D (Fig. R18b''). Aunque la aplicación de RAA no afectó a su expresión (Fig. R18c''), la aplicación de FGF4 (solo o en combinación con RAA) provocó su extensión por todo el eje P-D (Fig. R18Bd'' y e''), sugiriendo que tanto bajos niveles de señalización de RA como altos de FGF son necesarios para la transición *Meis1/Hoxa11*. En cuanto a *Hoxa13*, mientras ninguno de los sRLs analizados mostraba la más mínima expresión (n=6, Figura R18Ba'''), dos zRLs tenían un pequeño dominio distal (n=5, Figura R18Bb''). La aplicación de RAA a los sRLs consiguió en tres especímenes una activación prematura de *Hoxa13* (n=6, Figura R18Bc'''), aunque dicho efecto no fue conseguido al aplicar FGF4, solo o en combinación con RAA (Fig. R18Bd'' y e''', n=2 de cada).

30 htt, el límite entre los dominios de *Meis1* y *Hoxa11* ya era más definido en los sRLs, ocupando *Hoxa11* la zona totalmente negativa de *Meis1* (Fig. R18Ca y a''). En los zRLs, *Hoxa11* seguía ocupando todo el eje, aunque su expresión se hacía más débil en la zona proximal, donde se iba a empezar a formar la condensación. De nuevo, la expresión de *Meis1* en los sRLs era inhibida por RAA y FGF4 (Fig. R18Cc, d y e). En cuanto a *Hoxa11*, su expresión no se vio afectada por RAA, aunque sí resultó expandida por FGF4 y RAA+FGF4 (Fig. R18Cc'', d'' y e''). *Hoxa13* ya estaba presente en todas las condiciones analizadas, aunque en sRLs tratados con



#### IV. RESULTADOS

RAA y zRLs daba la impresión de estar más expandido que en el resto de condiciones, lo que unido a los resultados de 20 htt sugería que llevaba más tiempo activado en ese tipo de RLs.



**Figura R18.** Dinámica transcripcional de los recombinantes, dependiendo del sitio de injerto y el tratamiento. **A – C**, El sitio de injerto y el tipo de microesferas aplicadas se indica en la parte superior de cada sección, y los transcritos analizados en la parte izquierda. La expresión de los distintos marcadores se analizó en secciones adyacentes, y se usaron al menos dos especímenes por condición. Los puntos temporales analizados fueron 8 (**A**), 20 (**B**) y 30 horas (**C**) tras el injerto. Los asteriscos negros indican la posición de las microesferas cargadas con FGF4, y los rojos la de las microesferas con RAA. Las líneas discontinuas rodean el tejido del recombinante. En **B** y **C**, las puntas de flecha señalan el incipiente dominio de expresión de *Hoxa13*, que en ocasiones sólo era apreciable en secciones no adyacentes (NA) de las otras que se muestran. La foto mostrada en **Ae'** corresponde a otro espécimen que el que se muestra en **Ae** y **Ae''**. Las barras de escala equivalen a 250 micras. La flecha en **Bd** señala un pequeño dominio de expresión remanente de *Meis1*. **D**, Representación esquemática que resume los principales resultados observados. Los sitios de injerto se indican a la izquierda, y las horas tras la operación se indican en la parte superior. Los distintos dominios de expresión se representan con los colores indicados. Los degradados de color indican expresión en gradiente. El AER aparece en color azul pálido.

Los resultados indicaban por tanto que mientras que *Meis1* respondía de manera opuesta a RA y a FGF, *Hoxa11* respondía directamente sólo a FGF. Sin embargo, *Hoxa13* no parecía ser activado directamente por ninguna de las señales exploradas (de hecho FGF4 parece tener un efecto negativo en su expresión, algo ya descrito en (Vargesson *et al.*, 2001)), si bien el tiempo

total necesario para su activación sí podía modificarse dependiendo de las señales endógenas y exógenas. Esta diferencia entre la transición *Meis1/Hoxa11* y la *Hoxa11/Hoxa13* parecía marcar un punto de inflexión en la formación de patrón P-D, por lo que se exploró más en detalle.

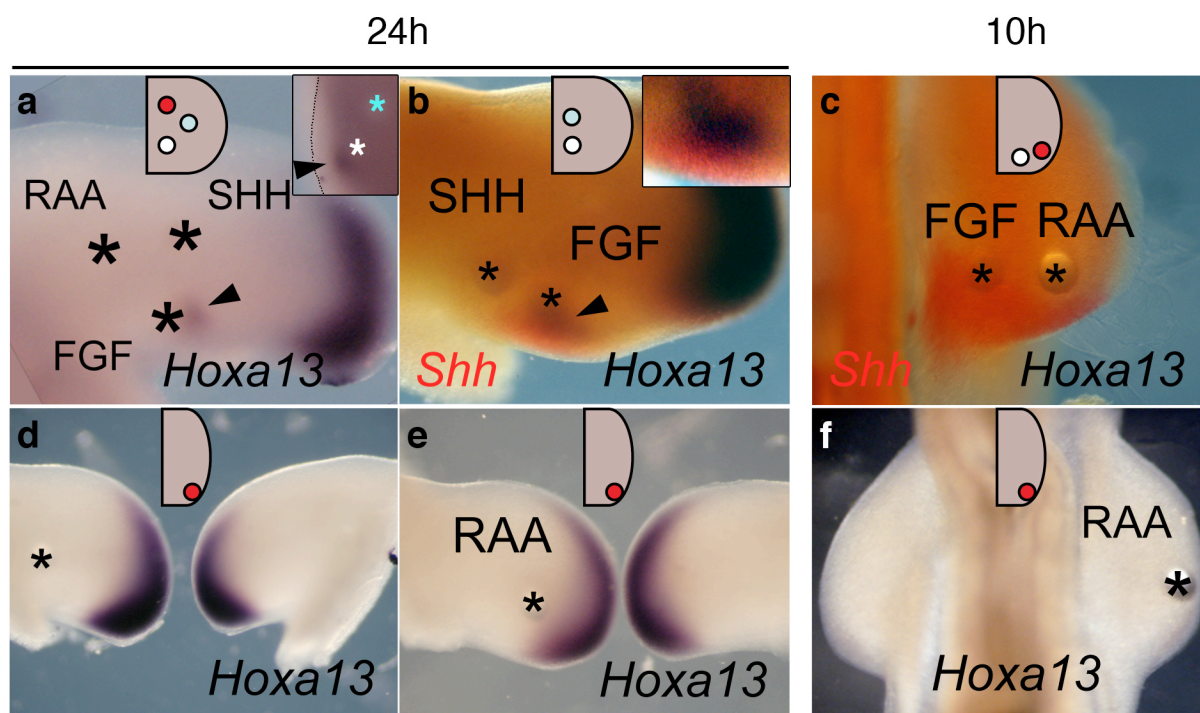
Mediante diversas combinaciones de señales aplicadas al primordio de extremidad en desarrollo, se intentó acortar el tiempo que normalmente transcurre entre la activación de *Hoxa11* y la de *Hoxa13*, es decir, se intentó conseguir la activación precoz de este último. Las señales que se probaron fueron las proteínas SHH (1 mg/ml) y FGF8 (1 mg/ml), y el RAA BMS493 (2.5 mg/ml). Microesferas cargadas con estas sustancias fueron insertadas en diferentes posiciones y combinaciones de primordios de estadios 18 – 21 HH. Como primera aproximación se dejó actuar a la(s) sustancia(s) exógena(s) durante 24 horas, tiempo suficiente para que apareciera el dominio endógeno de *Hoxa13*, para ver si se podía expandir ese dominio. De encontrarse una combinación de señales capaz de activar *Hoxa13* ectópicamente, se probaría esa misma combinación a tiempos más cortos para ver si también era capaz de provocar una activación precoz. Se probaron todas las combinaciones de las 3 sustancias en las que bien la microesfera de FGF8 o la de RAA quedaba insertada en la zona posterior del primordio de extremidad. Tras 20-24 horas, las únicas combinaciones que activaban *Hoxa13* de manera ectópica fueron las que tenían las microesferas de FGF8 en la parte proximal posterior (Fig. R19a y b, n=2/4). Se ha descrito que este tipo de tratamiento puede activar la expresión de *Shh* en dominios ectópicos (Yang y Niswander, 1995) (ver también Fig. R19b y c), y también que SHH es necesario para la expresión de *Hoxa13* en precursores musculares, aunque no en el mesénquima (Hashimoto *et al.*, 1999). Por tanto, cabía la posibilidad de que *Hoxa13* se estuviera activando en respuesta al dominio ectópico de *Shh*. No obstante, al insertar una microesfera cargada con SHH cerca de la de FGF8, no se vio que el dominio *Hoxa13* se extendiera hacia aquella (Fig. R19b), por lo que ambos efectos causados por FGF8 (activación de *Shh* y activación de *Hoxa13*) probablemente fueran independientes. De hecho, parecía que para la expresión ectópica de *Hoxa13* se requería la proximidad al ectodermo, pues el nuevo dominio de expresión sólo aparecía en esa región (detalle en Fig. R19a). En cualquier caso, cuando se repitió el experimento analizando a tiempos más cortos (~10 horas), nunca se observó expresión precoz de *Hoxa13* (Fig. R19c, n=8), pese a que se probaron todas las combinaciones de una, dos o tres sustancias, manteniendo fija la microesfera de FGF8 en la zona proximal posterior. Cabían dos explicaciones para esta dependencia temporal: el tiempo necesario para la transición *Hoxa11/Hoxa13* no se podía alterar mediante señales, o bien un exceso de señalización FGF tenía un efecto inhibitor sobre *Hoxa13*, y sólo al diluirse con el tiempo hasta niveles más moderados era posible la expresión del marcador distal. De hecho existían evidencias en la literatura que apuntaban a esta última posibilidad (Vargesson *et al.*, 2001), y nuestros datos de recombinantes tratados con FGF4 también sugerían lo mismo (Fig. R18Bd'' y Cd'''). Por tanto, interesaba conseguir la activación ectópica de *Hoxa13* sin recurrir a FGFs, por ver si en ese caso sí sería posible una activación precoz. En un intento de proporcionar todo lo que se estimaba necesario para la expresión de *Hoxa13*, se decidió colocar microesferas cargadas con RAA en la zona posterior distal del primordio de extremidad de estadio 19-20 HH (ver dibujos explicativos en Figura R19d, e y f). Así, esa región tendría influencia del ectodermo posterior, del AER, y bajos niveles de señalización de RA. Como control positivo del experimento, se dejaron crecer durante el tiempo suficiente para que el dominio endógeno estuviera presente. En estas condiciones se observó una expansión entre moderada y notable del dominio endógeno de *Hoxa13* (Fig. R19d y e, n=5/7). No obstante, cuando se redujo el tiempo de tratamiento para intentar obtener una expresión precoz, no se consiguió en ningún caso (Fig. R19f, n=6).

De los experimentos anteriores se concluyó por tanto que el comportamiento de *Hoxa13* era cualitativamente distinto al de *Meis1* y *Hoxa11*, en el sentido de que su dinámica de activación



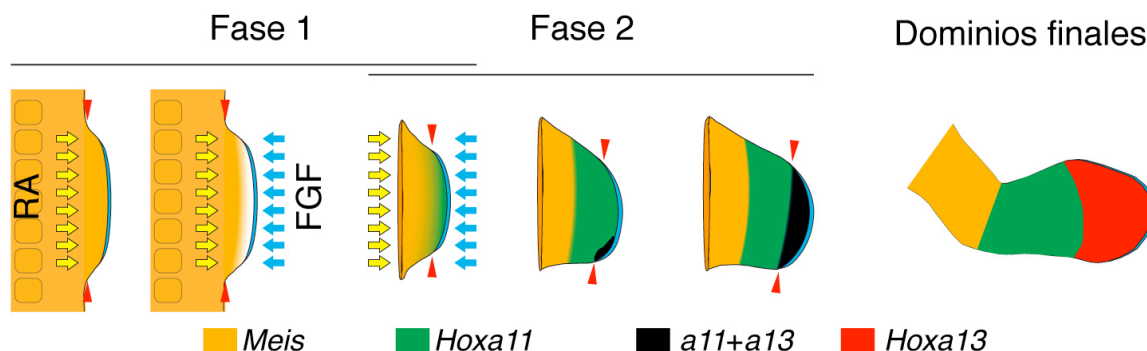
#### IV. RESULTADOS

parecía responder a un mecanismo autónomo y no se podía alterar mediante señales exógenas o endógenas.



**Figura R19.** Intentos de activación precoz y/o ectópica de *Hoxa13*. La duración aproximada del tratamiento se indica en la parte superior, y la combinación de señales utilizadas se indica en el dibujo que acompaña cada panel. Las microesferas de FGF8, SHH y RAA aparecen en blanco, azul y rojo, respectivamente, y su posición es señalada por los asteriscos. **a - c**, Aplicación de microesferas cargadas con FGF8 en la zona posterior proximal, solas o en combinación con otras señales. Las puntas de flecha señalan el dominio ectópico de *Hoxa13*. El detalle en **a** muestra una vista antero-dorsal, con el margen externo del ectodermo delineado por una línea de puntos. Los especímenes en **b** y **c** fueron analizados mediante una hibridación *in situ* doble para *Shh* (rojo) y *Hoxa13* (negro). El detalle en **b** muestra los dominios ectópicos de *Shh* y *Hoxa13* a mayor aumento y tras aplicar la herramienta niveles automáticos de Adobe Photoshop. **d - f**, Aplicación de microesferas cargadas con RAA en la parte postero-distal del primordio de ala. Nótese en **d** y **e** que la extensión P-D del dominio posterior de *Hoxa13* es mayor en el primordio experimental que en el contralateral, así como la ausencia de expresión en **f**. Todos los primordios experimentales aparecen en visión dorsal, con el eje P-D orientado de izquierda a derecha.

Los resultados expuestos en este apartado encajan mejor en un modelo bifásico de especificación P-D (Fig. R20). En la primera fase, el equilibrio entre los efectos opuestos de RA y FGF sobre *Meis1* y *Hoxa11* establecería la primera subdivisión del eje P-D. Después, la inactivación de *Meis1* actuaría como un interruptor para que comenzara la segunda fase, gobernada probablemente por la regulación autónoma celular del *cluster* Hox, lo que acabaría conduciendo a la expresión secuencial y anidada de los genes *Hox* (ver Discusión).





**Figura R20 (página anterior).** Modelo bifásico de formación de patrón P-D. Los dominios de expresión están coloreados como se indica. Los degradados significan expresión en gradiente. Las flechas amarillas y azules indican señalización de RA y FGF, respectivamente. Las puntas de flecha rojas marcan el frente de diferenciación, proximal al cual la identidad P-D queda fijada (Tabin y Wolpert, 2007). El sesgo posterior en la expresión inicial de *Hoxa13* probablemente indica la participación de algún mecanismo relacionado con la polaridad A-P. La visión mostrada es dorsal, con el eje P-D orientado de izquierda a derecha.

#### IV.3.4 Comprobación del modelo bifásico en extremidades no recombinantes.

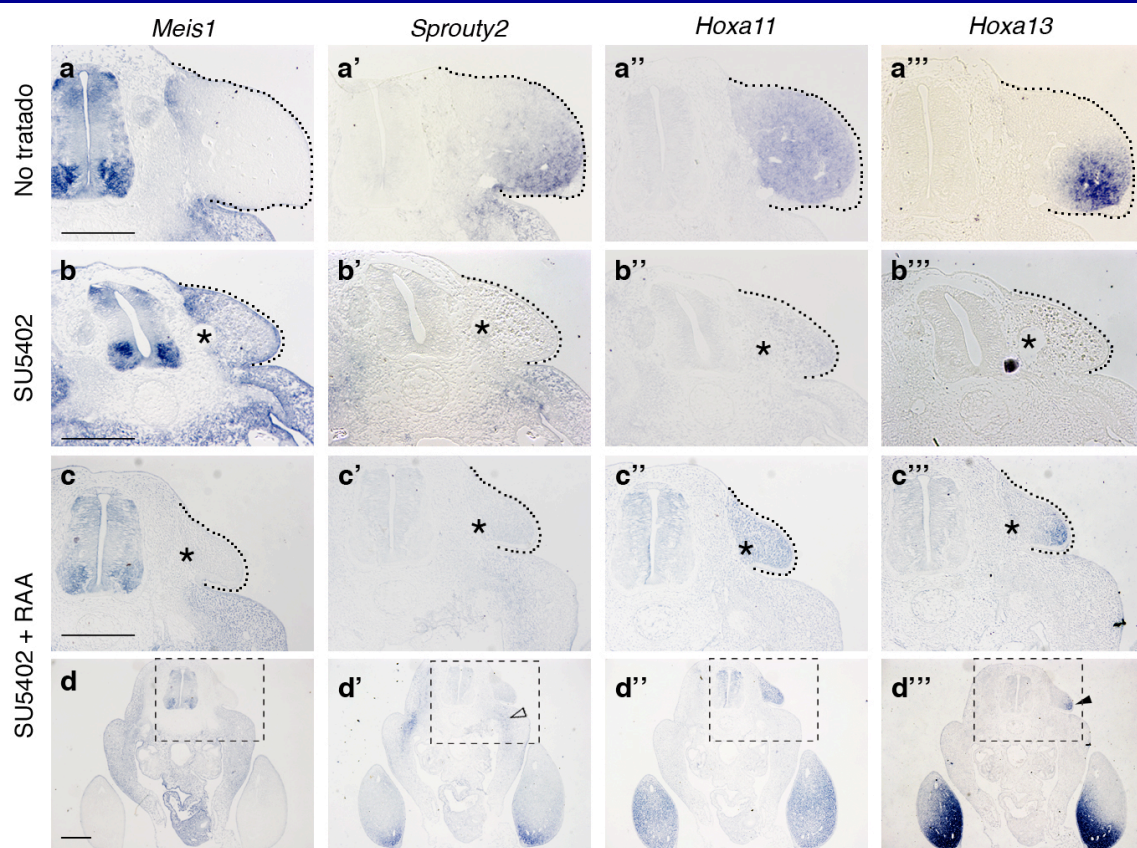
Para comprobar si el modelo inferido en el apartado anterior era válido, se decidió ponerlo a prueba en trasplantes distales (de 200 micras) de extremidades no recombinantes. Como ya se vio en la Figura R11, la inhibición de la señalización FGF en trasplantes injertados en somitos daba lugar a la activación de *Meis1* en el injerto. Se procedió entonces a analizar cuál era el efecto sobre *Hoxa11* y *Hoxa13*. Se usaron exclusivamente primordios de estadio 19-20 HH, cuyas células distales ya han inactivado *Meis1* y activado *Hoxa11*, es decir, acaban de superar la Fase 1 del modelo. Se utilizaron primordios tanto de pata como de ala. La expresión de *Sprouty2* sirvió como indicador de señalización de FGF.

A 22 htt, mientras que los trasplantes no tratados expresaban *Hoxa11* a lo largo de todo el mesénquima y *Hoxa13* en un dominio distal, los tratados con SU5402 (2.5 mg/ml) expresaban niveles muy bajos de *Hoxa11* y nulos de *Hoxa13* (Fig. R21 a'' y b'', a''' y b''', n=4 controles (2 de ala), 7 experimentales (4 de ala)). Esto, unido a la reactivación de la expresión de *Meis1* (comparar Figura R21a y b), sugería que la pérdida de señalización FGF provocaba una ganancia de señalización RA que era capaz de revertir la Fase 1.

En cuanto a la Fase 2, para comprobar su independencia de señales se hizo un experimento similar, pero tratando los trasplantes no sólo con microesferas de SU5402 (5 mg/ml), sino cargadas también con RAA (4 mg/ml). De esta manera, los trasplantes dejaban de recibir tanto señalización RA como FGF (Fig. R21c y d, c' y d'), evitándose la reversión de la Fase1. En estas condiciones, la expresión de *Hoxa11* estaba presente en todo el recombinante (Fig. R21c'' y d'', 100% de los casos, n=4 de ala y 3 de pata), signo de que no se había retrocedido en el estado de especificación. Por su parte, *Hoxa13* llegó a activarse en el dominio distal (Fig. R21c''' y d''', n=3/4 (ala) y 3/3 (pata)). Estos resultados indicaban que la señalización FGF sólo es instructiva durante la Fase 1, pero que una vez ocurre la transición *Meis1/Hoxa11*, se vuelve prescindible para la progresión de la Fase 2.

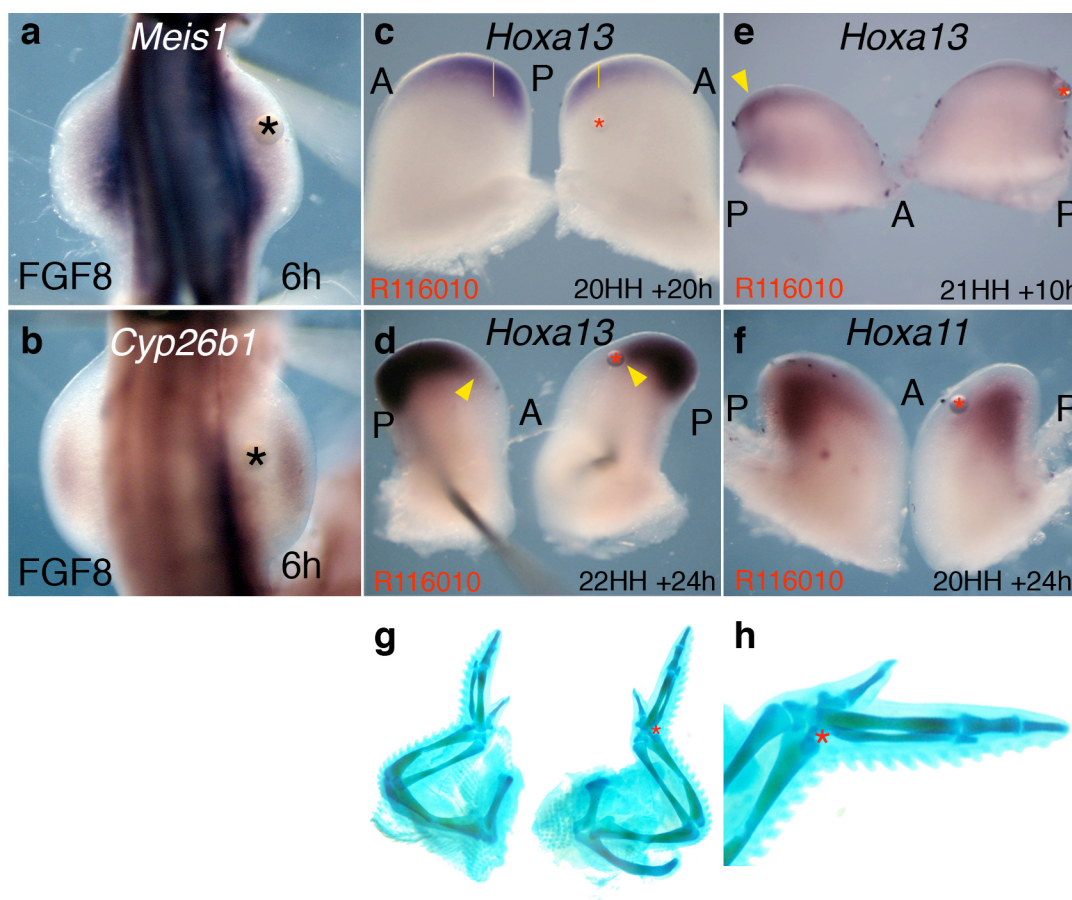
**Figura R21 (página siguiente).** La señalización FGF sólo es necesaria durante la Fase 1. El tipo de tratamiento está indicado en la parte izquierda, y los transcritos analizados por hibridación *in situ* en secciones adyacentes se indican arriba. Los asteriscos marcan la posición de las microesferas. Las líneas de puntos delimitan los trasplantes. En d - d''' se muestran imágenes a menor aumento de c - c''', para permitir la comparación con los primordios de extremidad del receptor. El rectángulo delimita la zona correspondiente a c - c'''. La punta de flecha rellena en d''' señala el dominio *Hoxa13*, mientras que la hueca en d' señala que la expresión endógena de *Sprouty2* en el mesodermo lateral se vio afectada por la alta concentración de SU5402 aplicada al injerto. Es destacable que el primordio de pata de HH19-20 ya ha empezado a expresar *Hoxa13*, por lo que los resultados obtenidos con primordios de ala son más válidos para alcanzar la conclusión mencionada en el texto principal.

#### IV. RESULTADOS



Una vez el modelo estaba definido y comprobado, se intentó refinarlo. Si la segunda fase era independiente de señales, llamaba la atención que desde estadio 19-20 HH hasta bien avanzado el desarrollo, CYP26B1 estuviera expresándose en la parte distal (Fig. D2, (Reijntjes *et al.*, 2003)). Se podría pensar que su presencia es necesaria para degradar el RA que llegue a la parte distal y así permitir la distalización progresiva. Sin embargo, la señalización debida a FGF es capaz de inhibir rápidamente la señalización por RA ((Mercader *et al.*, 2000), Figura R22a) sin necesidad de inducir *Cyp26b1* (Fig. R22 b, n=3), por lo que éste último quizá se necesite para procesos más sutiles. Para comprobarlo, se implantaron en la parte distal del primordio de extremidad (20-22 HH) microesferas cargadas con el compuesto R116010 (0.5 – 10 mg/ml), un inhibidor potente y específico de la familia de enzimas CYP26 (Van Heusden *et al.*, 2002; Njar *et al.*, 2006; Armstrong *et al.*, 2007; Bruno y Njar, 2007). Tras 20-24 horas de tratamiento, el bloqueo de la degradación de RA endógeno provocó una cierta inhibición/retraso en la expresión de *Hoxa13*, que afectaba especialmente a su extensión P-D (Fig. R22c, n=8/10) y a su expansión A-P (Fig. R22d, n=9/10). Para ver si sólo se veía afectada la expansión de *Hoxa13*, o si por el contrario su expresión inicial también era dependiente de la degradación de RA endógeno, se repitió el experimento pero analizando a las 10 horas. En algunos casos se observó que en el primordio experimental no había expresión de *Hoxa13*, cuando sí la había en el control (Fig. R22e, n=2/5), y en el resto de casos el dominio de *Hoxa13* estaba presente, aunque era más pequeño que en el control. En cuanto a *Hoxa11*, el efecto no estaba muy claro, y sólo en un caso parecía haber cierta inhibición sutil (Fig. R22f, n=4). Cuando los especímenes tratados con R116010 se dejaron crecer 6 ó 7 días para comprobar el efecto sobre el patrón esquelético final, no se observaron defectos importantes (Fig. R22g y h, n=3), lo que sugería que ese retraso en la expresión de *Hoxa13* no era excesivamente relevante en el proceso de formación de patrón.

En resumen, los resultados sugerían que para que la expresión inicial y la posterior expansión de *Hoxa13* ocurran en el momento adecuado, se requiere que la cantidad de RA endógeno sea mantenida a un nivel mínimo o nulo. Este mecanismo quizá indique que si bien la Fase 2 es un proceso principalmente autónomo celular, puede tener cierta interacción con señales no autónomas (ver Discusión).



**Figura R22.** La degradación de RA endógeno por parte de CYP26B1 es necesaria para la correcta expresión y expansión de *Hoxa13*. **a y b**, Tras 6 horas con una microesfera de FGF8 (asterisco negro), se observa una inhibición de *Meis1* (**a**), pese a que no hay expresión ectópica de *Cyp26b1* (**b**). **c - f**, Efecto que la inhibición de CYP26B1 con microesferas de R116010 (asteriscos rojos) tiene sobre la expresión de *Hoxa13* (**c - e**) y de *Hoxa11* (**f**). En **c**, las barras amarillas corresponden a la extensión P-D del dominio *Hoxa13* en posiciones equivalentes del primordio control (izquierda) y el experimental (derecha, ambos en visión ventral). En **d**, las puntas de flecha señalan el límite anterior de expresión de *Hoxa13*. En **e**, la flecha amarilla señala la expresión incipiente de *Hoxa13* en el primordio control. En **c - f**, el estadio de la operación y el tiempo que se dejó progresar al espécimen antes del análisis se indican en la parte inferior derecha. A= anterior y P= posterior. **g y h**, Efecto de la inhibición de CYP26B1 sobre el patrón esquelético. El asterisco rojo marca la posición de la microesfera cargada con R116010. En **g** se muestran tanto la extremidad control como la experimental, y en **h** la extremidad experimental es mostrada a mayor aumento.



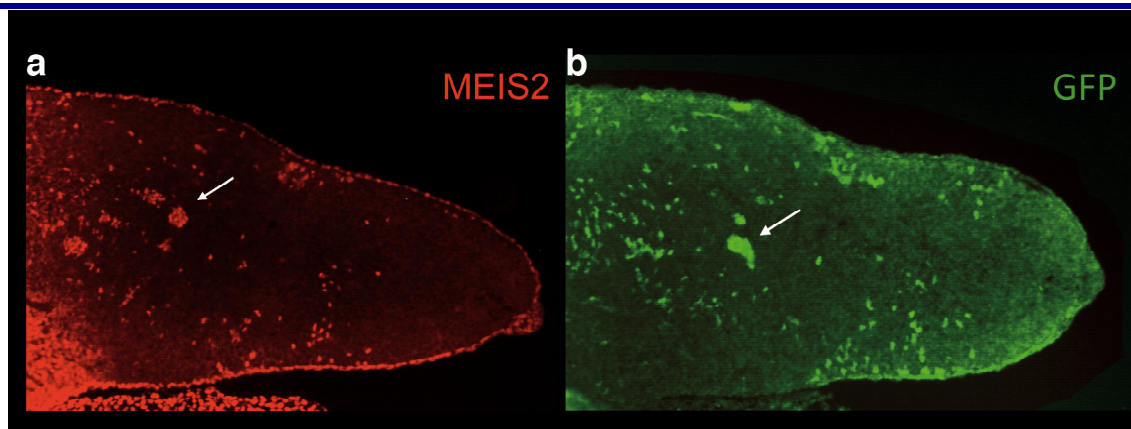
### IV.4. Papel de *Meis2* en el desarrollo P-D de la extremidad.

#### IV.4.1 Sobreexpresión aleatoria de *Meis2*. Diferencias en la distribución celular.

Uno de los grandes enigmas en la formación de patrón P-D se refiere al papel que los marcadores de segmento (*Meis1/2*, *Hoxa11* y *Hoxa13*) pueden tener en dicho proceso. El menos estudiado de ellos es *Meis2*, así que se decidió estudiar su posible función. Ante la imposibilidad de generar una línea mutante para *Meis2*, debido a que los individuos heterocigotos fracasan durante el desarrollo temprano (C.G. Arques, G. Giovinozzo y M. Torres, no publicado; N.G. Copeland, comunicación personal), y ante las dificultades técnicas para generar un mutante condicional, se decidió estudiar el papel del gen de la familia TALE *Meis2* mediante su sobreexpresión.

Con anterioridad se había generado en el laboratorio la línea R26R*Meis2a*-IRES-EYFP, capaz de dirigir la expresión de *Meis2* en todos los tejidos del embrión de ratón, siempre que presenten actividad Cre recombinasa (C.G. Arques, G. Giovinozzo y M. Torres, no publicado). Además de *Meis2*, las células en que se producía la recombinación (así como todos sus descendientes, es decir, su linaje) expresaban la proteína fluorescente EYFP, permitiendo el seguimiento de dichas células. Al cruzar dichos ratones con otra línea en la que CreER<sup>T2</sup> (Cre recombinasa inducible por tamoxifeno) se expresaba de manera ubicua, se generaron embriones en los que todas sus células tenían la posibilidad de ser marcadas en el momento de interés, dependiendo la frecuencia de marcaje de la cantidad de tamoxifeno inyectada (Arques *et al.*, 2007). Como control que sirviera de referencia con la que comparar el comportamiento de los clones *Meis2*, se usó la línea R26R (Soriano, 1999). De este modo, combinando los diversos alelos mencionados en las líneas usadas para los cruces, se obtuvieron embriones en los que aparecían dos tipos de células marcadas: células LacZ, de comportamiento silvestre ya que sólo expresaban el gen de la  *$\beta$ galactosidasa*; y células *Meis2*, de comportamiento potencialmente aberrante. En el laboratorio ya se había comprobado con anterioridad que el seguimiento de las células *Meis2* se podía hacer mediante detección de la proteína fluorescente (normalmente mediante anticuerpo, Figura R23a y b), y que los niveles de expresión alcanzados mediante el promotor ROSA26 eran similares o menores que los niveles endógenos (Fig. R23a). Estos niveles de expresión resultan adecuados para tener una cierta seguridad de que los efectos observados no son debidos a que una expresión masiva del transgén provoca un comportamiento celular anómalo. Sólo muy infrecuentemente (~1/1000) se encontraron casos de doble marcaje, y obviamente se contabilizaron como células *Meis2*.

Teniendo en cuenta que desde la inyección de 4HT hasta que se produce el pico máximo de recombinación pasan unas 12 horas (Arques *et al.*, 2007), que después tiene que producirse la transcripción y traducción de la secuencia codificante de *Meis2*, que a continuación la proteína MEIS2 tiene a su vez que actuar sobre sus dianas transcripcionales y que por último éstas darán lugar a una serie de comportamientos celulares, se decidió estudiar la distribución de células marcadas a tiempos largos tras la inducción. Se realizaron dos bloques de experimentos. En ambos se extrajeron los embriones a E12.75, pero la inducción se había realizado bien a E8.5 o a E9.5 (una sola inyección intraperitoneal de 0.8 mg de 4HT). Tras un análisis preliminar, ambas aproximaciones dieron resultados similares en cuanto a número y distribución de clones. Salvo que se indique lo contrario, de ahora en adelante los datos presentados pertenecen al bloque de inyecciones a E8.5.



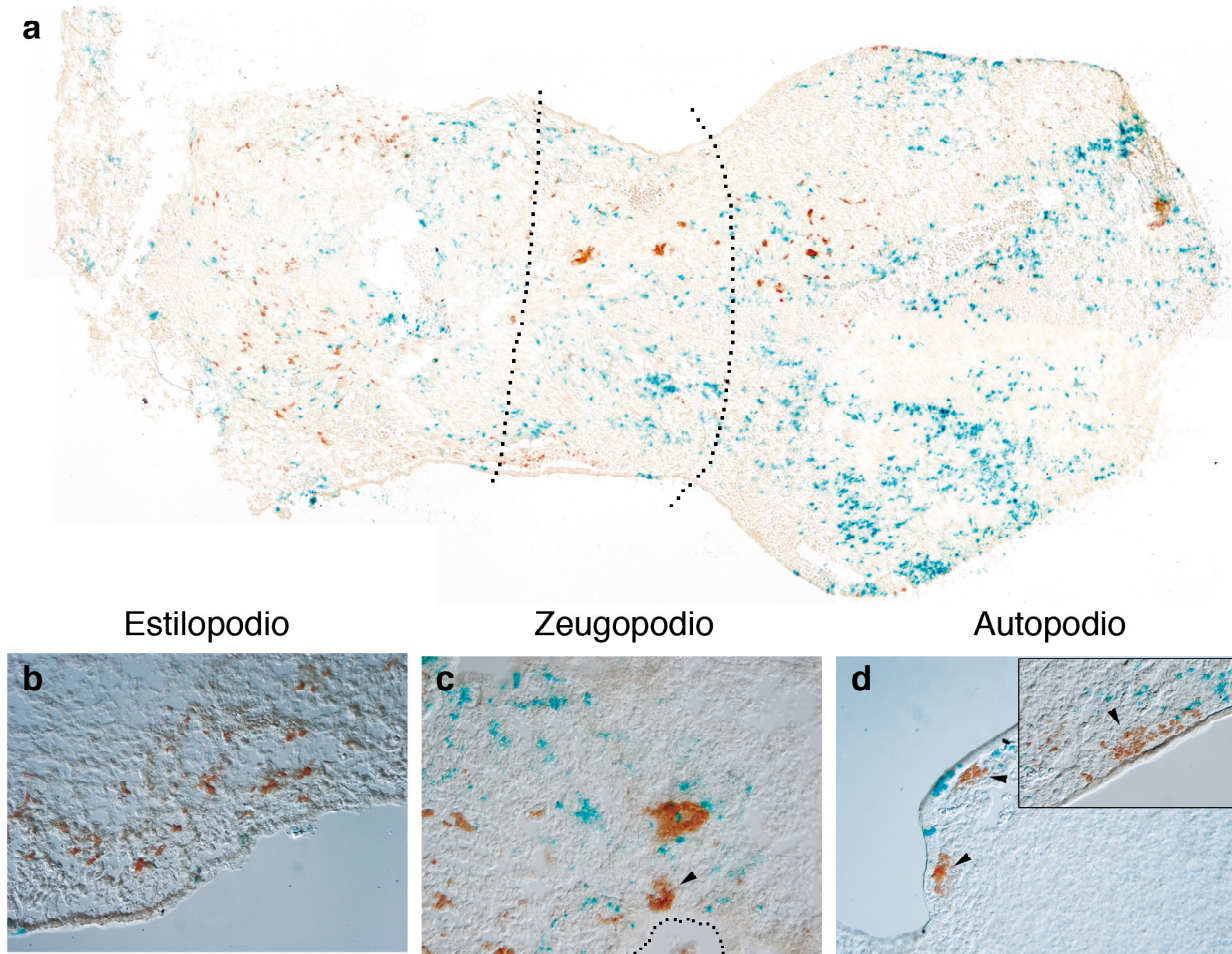
**Figura R23.** Sobreexpresión de *Meis2* en clones de inducción aleatoria. **a** y **b**, secciones transversales cuasi-adyacentes a la altura del primordio de extremidad. Los clones inducidos se pueden detectar tanto con anticuerpo anti-MEIS2 (**a**) como con anti-GFP (**b**). Nótese que el nivel de expresión alcanzado en las regiones ectópicas (derecha en panel **a**) es similar o menor al endógeno (izquierda en panel **a**). Las flechas señalan un agrupamiento de células que sobreexpresan *Meis2*. El eje P-D discurre de izquierda a derecha. Las tinciones fueron realizadas por Carlos G. Arques.

Tras la tinción LacZ del embrión completo, las extremidades fueron incluidas en OCT, cortadas en criostato a lo largo del plano definido por los ejes A-P y P-D (12 micras de grosor) y procesadas para inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-GFP. Ante la impracticabilidad de analizar todas las secciones de todas las extremidades generadas, se decidió analizar una muestra representativa elegida lo más aleatoriamente posible. Los dos únicos criterios que debían cumplir las secciones para incluirlas en el análisis eran que todo el eje P-D estuviera representado, y que la calidad del tejido y de las tinciones fueran adecuadas para distinguir sin ambigüedad las células marcadas de las no marcadas. Tras este procesamiento y análisis, dos aspectos llamaban la atención a primera vista. El primero era que el número total de células *Meis2* parecía ser menor que el número total de células LacZ, siendo esto especialmente patente en la región del autopodio (Fig. R24a y d). El segundo era que, frecuentemente, las células *Meis2* no aparecían separadas unas de otras, sino que estaban estrechamente agrupadas, al contrario que las células LacZ. Este agrupamiento parecía ser exclusivo del zeugopodio y autopodio (Fig. R24b, c y d), donde normalmente no hay expresión de *Meis2*.

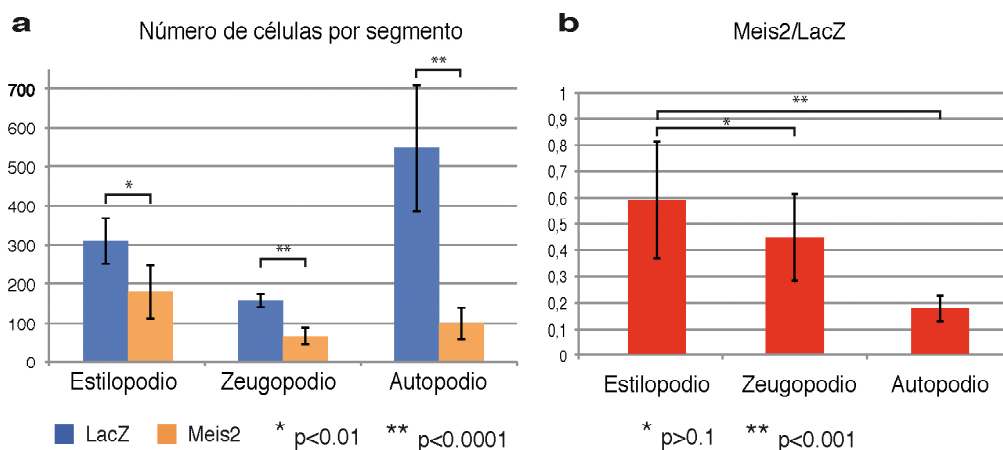
Para cuantificar estos dos aspectos, se procedió a contar el número de células de cada tipo en todas las secciones seleccionadas, distinguiendo entre los 3 segmentos P-D, y clasificando los grupos en base al número de células que contenían (entendiendo como grupo las células que están en contacto). Un total de 16 secciones (2 embriones, 4 extremidades por embrión, 2 secciones por extremidad) fueron analizadas manualmente (en Material Suplementario aparecen los datos crudos). De acuerdo con la impresión visual, el número de células *Meis2* en cada segmento resultó ser significativamente menor que el número de células LacZ (Fig. R25a). Se desconoce si esto era debido a un problema técnico en la detección o cuantificación de ambos tipos de marcaje (de ser éste el caso, sería especialmente importante en el estilopodio, donde quizá debido al daño del tejido durante la disección, la tinción GFP a veces se veía más débil), a que la recombinación de ambos tipos de alelos no era igualmente eficiente o a que en general la sobreexpresión de *Meis2* alteraba los parámetros de proliferación y/o apoptosis. En cualquier caso, teniendo en cuenta que el comportamiento de las células *Meis2* en el estilopodio era muy similar al de las LacZ (no formaban agrupamientos), que *Meis2* se expresa sólo en el estilopodio a partir de estadios intermedios, y que el estilopodio era el segmento en el que el número de células *Meis2* era más cercano al número de células LacZ (Fig. R25a y b), la interpretación más parsimoniosa era que en el estilopodio la sobreexpresión de *Meis2* no estaba provocando

#### IV. RESULTADOS

grandes efectos. Por tanto, se decidió calcular la proporción número de células Meis2 vs número de células LacZ en cada segmento y comparar dicho parámetro usando el del estilopodio como referencia. Mientras que en zeugopodio no se encontraron diferencias significativas, el número de células Meis2 estaba significativamente disminuido en el autopodio (Fig. R25b).

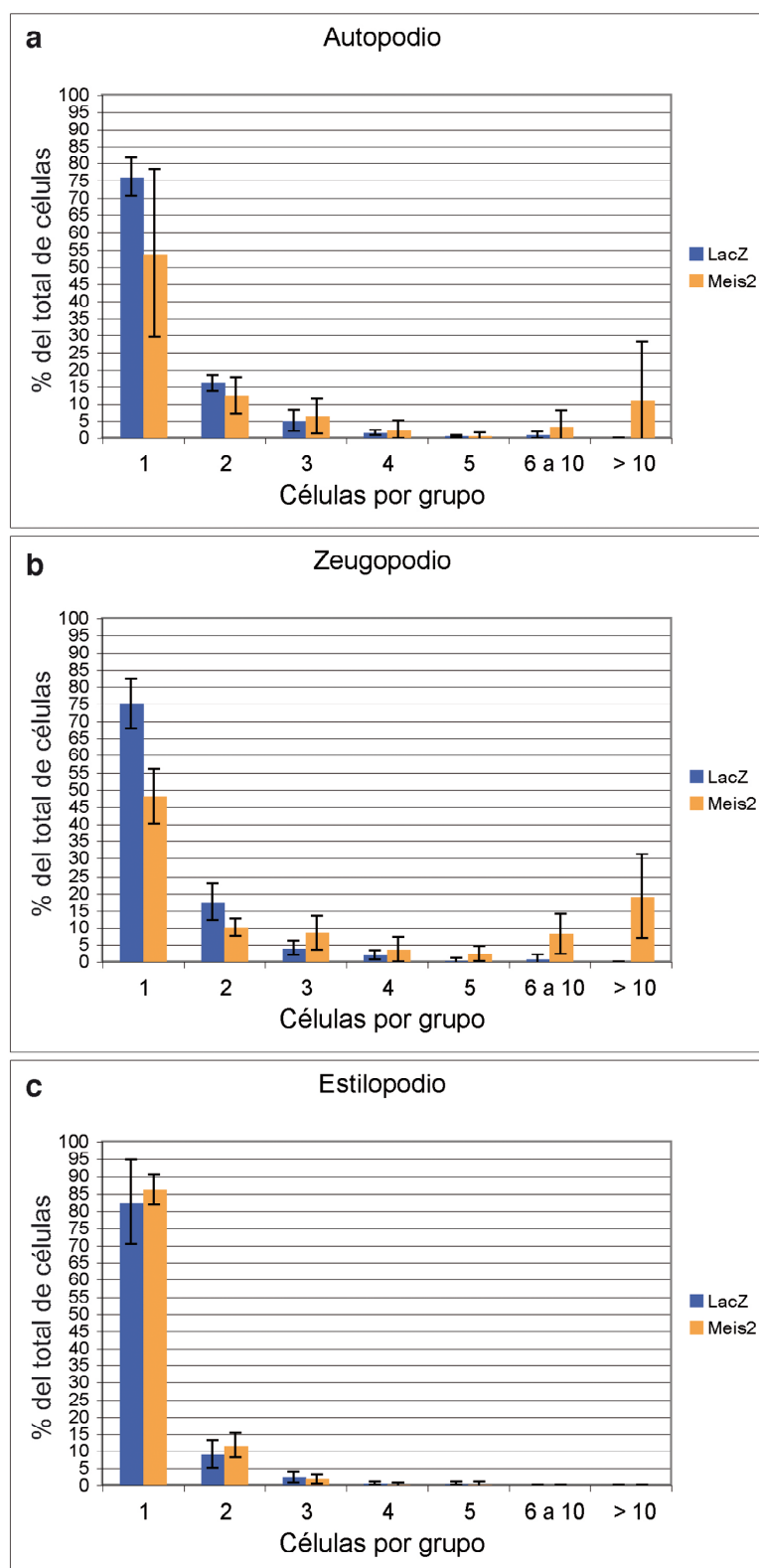


**Figura R24.** Ejemplos de extremidades con clones Meis2 (marrón) y LacZ (azul). **a**, Imagen multi-campo de una sección de extremidad inferior de un embrión de E12.75, con el eje P-D orientado de izquierda a derecha. Las líneas punteadas marcan los límites estilopodio/zeugopodio y zeugopodio/autopodio. **b – d**, capturas a mayor aumento de clones ubicados en estilopodio (**b**), zeugopodio (**c**) y autopodio (**d**). Nótese que las agrupaciones de células Meis2 aparecen sólo en zeugopodio y autopodio. Las puntas de flecha en **c** y **d** señalan grupos de células adyacentes al ectodermo (línea punteada en **c**), un fenómeno que se comentará más adelante. El detalle en **d** pertenece a otra región del autopodio del mismo espécimen.





**Figura R25 (página anterior).** Las células Meis2 están subrepresentadas en el autopodio. **a**, Gráfica que representa el número de células de cada tipo (media  $\pm$  desv. estándar) por segmento y por sección. La diferencia es significativa en todos los casos. **b**, Gráficas que representan la fracción Meis2/LacZ (media  $\pm$  desv. estándar) por segmento. Se tomó el estilopodio como referencia para la comparación estadística. (prueba t de Student emparejada con dos colas).



**Figura R26.** La tendencia de las células Meis2 a agruparse varía dependiendo del segmento P-D. **a – c**, Las gráficas representan para cada segmento el porcentaje de células de cada tipo que se encuentran en grupos de los tamaños indicados (media  $\pm$  desv. estándar). Todos los cálculos se hicieron con los datos de grupos de tamaño único (de 1 a 30 en incrementos de 1), aunque para su representación se sumaron los datos de los grupos entre 6 y 10 células, así como los de 11 a 30 células. Esos límites se establecieron porque aunque había unos pocos grupos de células LacZ con más de 5 células, ninguno tenía más de 9, mientras que había grupos Meis2 que llegaban a las 25 células. Nótese que en autopodio (**a**) y zeugopodio (**b**) las células Meis2 tienen una clara tendencia a formar grupos de mayor tamaño que las LacZ (tanto en términos absolutos como relativos). En el estilopodio (**c**), sin embargo, el comportamiento de ambas poblaciones celulares es prácticamente idéntico.

#### IV. RESULTADOS

En cuanto al parámetro de agrupamiento, para cada sección se construyó el histograma que representaba el número de grupos frente al número de células por grupo (de 1 hasta 30). Debido a las grandes diferencias en el número absoluto de células, la mejor forma de comparar ambas distribuciones era calcular para cada segmento qué porcentaje del número total de células era aportado por cada tipo de grupo (Fig. R26)\*.

En autopodio y zeugopodio la distribución de los grupos de células *Meis2* era claramente distinta de la de los grupos de células *LacZ* (Fig. R26a y b, en ambos casos la probabilidad de igualdad calculada mediante la prueba Chi cuadrado resultó ser 0, con 20 posiciones decimales). La principal diferencia radicaba en la categoría de grupos de más de 10 células, que no estaba presente en el caso de las células *LacZ*, pero representaban un 10-25% de las células *Meis2*. Sin embargo, en el caso del estilopodio, ambas distribuciones resultaron ser iguales con una probabilidad muy alta (0.99999999999999700 en la prueba Chi cuadrado, Figura R26c).

Una característica adicional de los grupos de células encontradas en zeugopodio y sobre todo en autopodio era que a menudo se encontraban en contacto con el ectodermo (Fig. R24c y d).

En resumen, la expresión ectópica de *Meis2* en la extremidad tenía dos tipos de efectos:

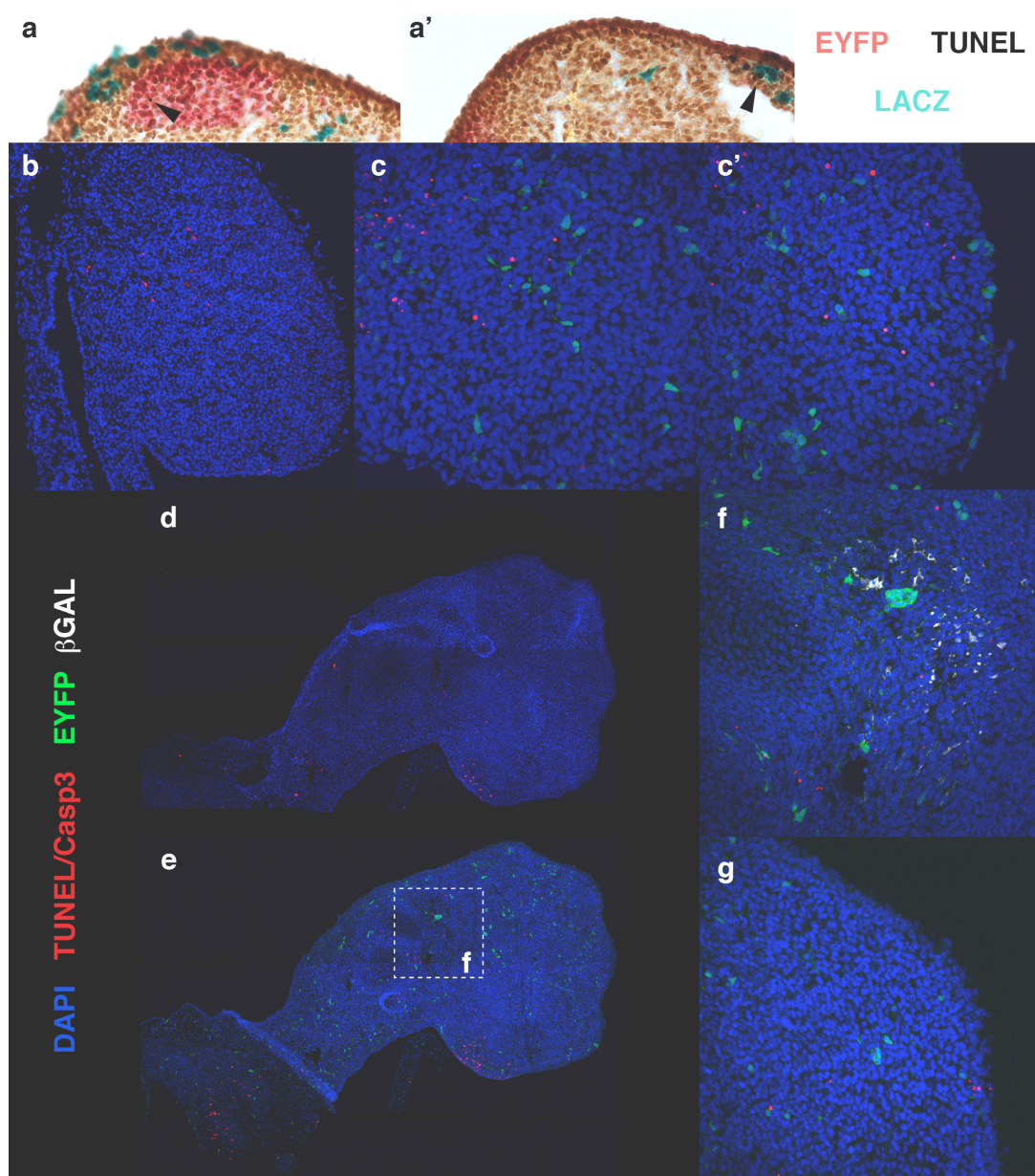
- En autopodio, las células que expresaban *Meis2* estaban menos representadas que las células control. Esto podía explicarse si las células *Meis2* en el autopodio eran capaces de reconocer que no estaban donde les correspondía, dando lugar a dos posibles efectos no excluyentes: migración activa desde el autopodio al estilopodio, donde ocurre la expresión normal de *Meis2* (Capdevila *et al.*, 1999; Mercader *et al.*, 1999), o disminución del número celular por disminución en proliferación o aumento de apoptosis. El fenómeno de relocalización de células proximalizadas con RA o que expresan *Meis1* ectópicamente ya ha sido descrito durante el desarrollo (Tamura *et al.*, 1997; Mercader *et al.*, 2000) y la regeneración de la extremidad (Crawford y Stocum, 1988a).
- En autopodio y zeugopodio, donde no hay expresión de *Meis2* a partir de un cierto estadio de desarrollo, las células que expresaban *Meis2* tenían una mayor tendencia a formar grupos que las células control. En el estilopodio, donde siempre hay expresión de *Meis2*, no se observó dicha tendencia. Una posible explicación sería que *Meis2* participa en un código de adhesión celular diferencial que permite distinguir a las células que lo expresan de las que no lo expresan. Alternativamente, podría ocurrir que las células que expresan *Meis2* en sitios donde no debería ser expresado se vean sometidas a algún tipo de estrés, que se ve aliviado al formar grupos donde se crea un microambiente afín. En este último caso, el contacto de los clones con el ectodermo podría ser otro mecanismo para aliviar ese estrés, porque en esa zona se evitaría el contacto con células mesenquimales que no expresen *Meis2*. Además, dicho estrés podría ser también el causante del putativo aumento de apoptosis o disminución de proliferación comentados en el punto anterior.

---

\* Debido a que las secciones para el análisis se escogieron al azar, no todas presentaban grandes agrupaciones de células, lo que influyó en la alta variabilidad observada. Otro efecto derivado de ese hecho es que probablemente se estaba subestimando la tendencia al agrupamiento de las células *Meis2*, ya que había casos individuales en que los grupos de más de 10 células constituían más del 50% de las células *Meis2* de un segmento (ver Material Suplementario), pese a que la media no supera el 10% en autopodio.

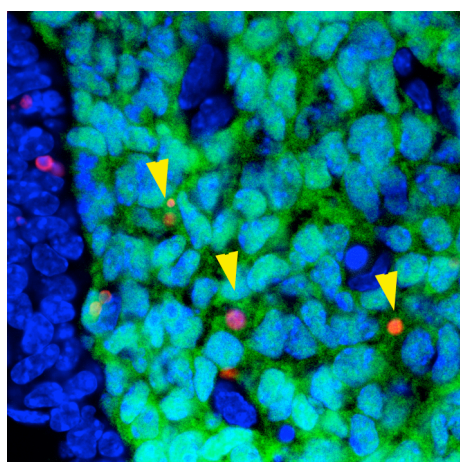
IV.4.2 Efectos de la sobreexpresión aleatoria de *Meis2* en las propiedades celulares.

Así pues, una de las hipótesis era que las células *Meis2* estaban siendo eliminadas, pasiva o activamente, cuando se encontraban en el autopodio. Para comprobarlo, se analizó el parámetro de muerte celular. Sin embargo, no se encontró una fuerte correlación entre la sobreexpresión de *Meis2* y un aumento de la frecuencia de muerte celular (Fig. R27a y a'). Dado que las secciones disponibles pertenecían a especímenes en los que la inducción había ocurrido mucho tiempo antes que el momento de análisis, era muy probable que la mayor parte de la muerte celular hubiera ocurrido ya. Por tanto, se decidió generar nuevos especímenes, en los que el tiempo transcurrido entre la inducción y el análisis no fuera tan grande. En concreto, se analizaron especímenes inducidos a E8.5 y fijados a E10.5 (grupo 1), así como especímenes inducidos a E10.5 y fijados a E12.75 (grupo 2). Sobre una misma sección se probaron diversas combinaciones de tinciones: TUNEL o anti-caspasa3 activada para muerte celular (Gavrieli *et al.*, 1992; Fernandes-Alnemri *et al.*, 1994), anti-GFP para detectar las células *Meis2*, y anti- $\beta$ GAL para detectar las LacZ. Hasta el momento se han analizado cuatro extremidades del grupo 1 y tres del 2, y la conclusión es que no parece haber correlación entre las células que expresan *Meis2* en regiones distales y las células apoptóticas (Fig. R27b – g).



**Figura R27 (página anterior).** Distribución de células apoptóticas, Meis2 y LacZ. Las distintas tinciones aparecen en los colores indicados. **a** y **a'**, Agrupamientos subectodérmicos en el autopodio de extremidades inducidas a E8.5 y analizadas a E12.75. Entre los 16 *clusters* Meis2 identificados en secciones de 8 extremidades, se encontraron 9 células positivas para TUNEL (punta de flecha). Entre los 7 *clusters* LacZ, se encontraron 2 células positivas para TUNEL. Sin embargo, la gran diferencia de tamaño entre ambos tipos de *clusters* da lugar a que estas diferencias no sean significativas. **b – c'**, Secciones confocales de cortes histológicos transversales de un embrión de E10.5. Se muestran: un campo amplio de todo el primordio (**b**), un aumento de la región proximal (**c**) y un aumento de la región distal (**c'**). Nótese que no parece haber una mayor cantidad de células apoptóticas en la región distal. **d – g**, secciones confocales de cortes histológicos de extremidades de E12.75. **d** y **e** muestran el eje P-D completo, **f** es un aumento de la transición zeugopodio-autopodio en **e**, y **g** la punta de un dígito. Nótese de nuevo la ausencia de correlación entre muerte celular y expresión de *Meis2*. Las células apoptóticas se detectaron mediante TUNEL (**c**, **c'**, **e**, **f** y **g**) o anti caspasa3 activada (**b** y **d**). La EYFP sólo se pudo detectar con anticuerpo cuando no se usó el anti caspasa3. La relación señal/ruido con el anti  $\beta$ GAL sólo resultó aceptable en algunas secciones (**f**). El eje P-D discurre de izquierda a derecha.

Un posible problema de este abordaje es que quizá las células apoptóticas, cuando ya son positivas para TUNEL o para caspasa3 activada, sean fagocitadas por sus vecinas. La subsiguiente bajada de pH en los lisosomas podría provocar una desnaturalización de la GFP que impidiera detectarla. Eso podría explicar por qué en general no se veía colocación de ambas señales. Para comprobarlo, se analizó la distribución de TUNEL y GFP en secciones en las que la densidad de marcaje GFP era muy alta en una región concreta de la extremidad (ver apartado IV.4.2), de forma que con una alta probabilidad debería coincidir la señal de TUNEL en alguna célula positiva para GFP. Dicho experimento control reveló que es perfectamente posible encontrar células positivas para ambas señales (Fig. R28), validando el abordaje y las conclusiones de la Figura R27.



**Figura R28.** Las señales de TUNEL y GFP pueden coexistir en el mesénquima de la extremidad. En rojo, verde y azul aparecen la señal de TUNEL, la señal de GFP y los núcleos, respectivamente. Las puntas de flecha señalan células positivas para TUNEL en las que claramente se mantiene la señal GFP.

Respecto al posible fenómeno de relocalización celular cuando células “proximales” se encuentran en un ambiente distal, además de los mencionados datos de la literatura, nuestros datos de trasplantes de pollo también parecían apoyar esa hipótesis. En los trasplantes de 200 micras a futuro zeugopodio, se observó que con mucha frecuencia la posición final del injerto en la extremidad receptora correlacionaba bastante bien con la identidad del elemento más proximal formado por el transplante (Z1, Z2, etc., Tabla VI).



Posición del injerto	estilop proxim	estilop interm	estilop distal	codo	zeugo proxim	zeugo interm	zeugo dist	muñeca	autop proxim	autop interm	autop distal
Elemento formado											
S3					1	1					
Z1				3+2	2	1					
Z2					1°	2+1					
Z3			1		1+1°	2	3	1			
A1					2	1+1	5	22+1	3		
A2					1	2	6	2	1		
A3							2				
¿?			1		4						

**Tabla VI.** Relación entre el elemento más proximal formado por un injerto en zeugopodio y su posición en la extremidad del receptor. Sombreadas en gris aparecen las posiciones en las que debería estar el injerto si hubiera un código de afinidad progresivo a lo largo del eje P-D y las células del injerto se movieran hasta encontrar una región con su mismo código. En S3, Z1, Z3 y A1, se ha incluido también la articulación más cercana en la zona sombreada. En rojo aparecen los injertos tratados con RA, ver texto principal más adelante (° significa que la microesfera y lo que se identificó como límite proximal del injerto estaban a bastante distancia. La posición indicada es la de la microesfera). ¿? Significa que no se pudo identificar sin ambigüedad qué elementos formó el injerto.

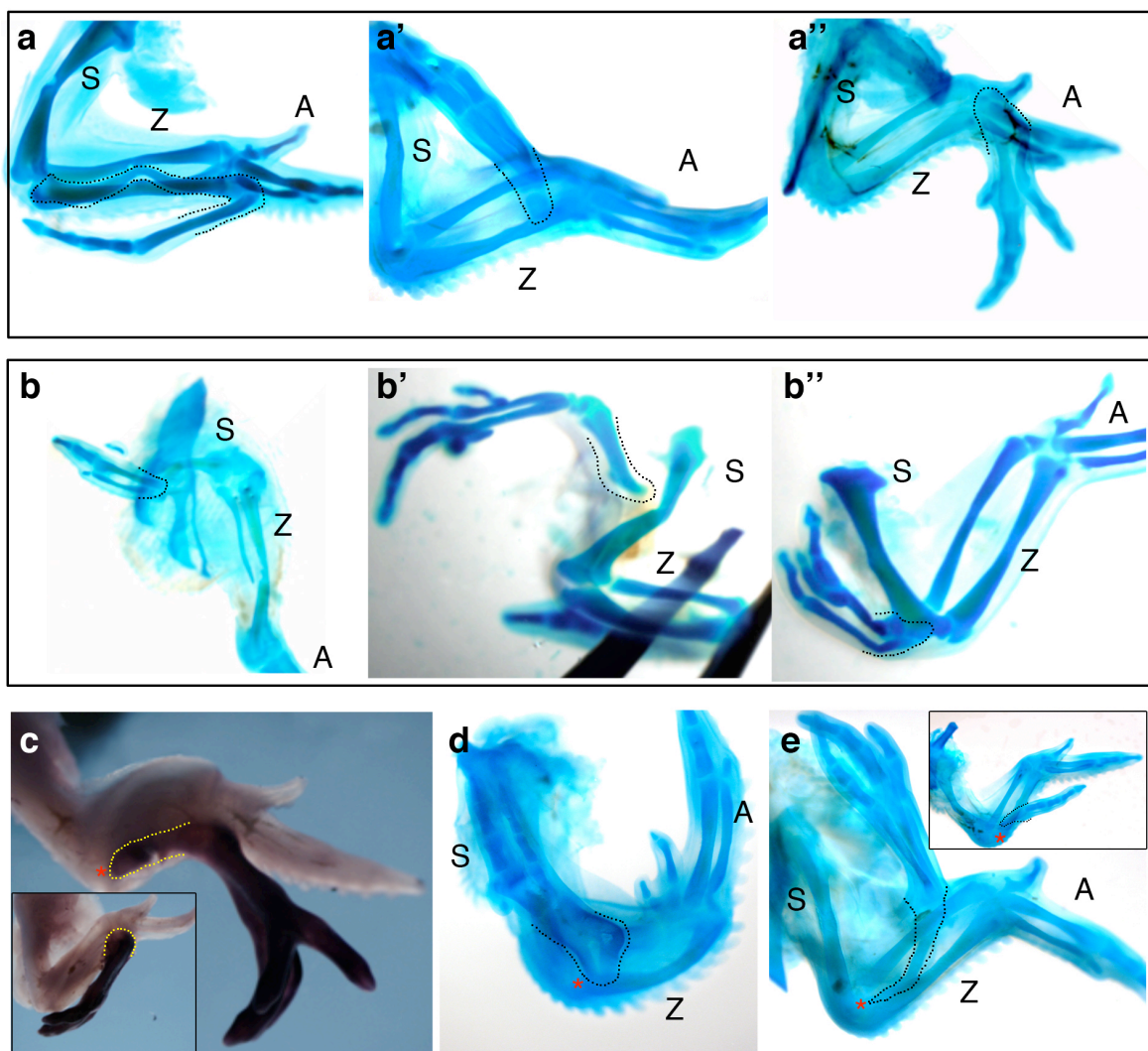
Así, los trasplantes que formaron Z1 acabaron en el codo del embrión receptor en un 75% de los casos (Fig. R29a), los dos que formaron Z2 acabaron en la región intermedia del zeugopodio, y el 66% de los que formaron Z3 acabaron en la zona distal del zeugopodio (Fig. R29a') o en la muñeca. Más del 70% de los que formaron A1 acabaron en la muñeca (Fig. R29a''), y sólo para los que formaron A2 y A3 no se encontró la correlación esperada, ya que acabaron mayoritariamente en la parte distal del zeugopodio o como mucho en la muñeca. Resulta destacable que cuando los injertos se realizaron en la zona proximal del primordio de ala de estadio 20, casi todos ( $n=8/10$ ) acabaron a distintos niveles a lo largo del estilopodio del receptor (los 2 restantes en el zeugopodio proximal), sin importar cuál fuera el elemento más proximal formado por el trasplante (Fig. R29b – b''). Por tanto, los resultados sugerían que, al menos a lo largo del zeugopodio, existe un gradiente de propiedades de adhesión que las células son capaces de interpretar. Se hipotetizó que las células de la extremidad en desarrollo, al igual que ocurre en regeneración de urodelos, en el caso de encontrarse en una región con propiedades de adhesión que no les son afines, podrían migrar hasta otra región donde se encontrasen más “cómodas”. Para comprobar esta hipótesis y ver cuál es el efecto que RA tiene en estas propiedades de adhesión, se repitieron los trasplantes a futuro zeugopodio, pero tratando algunos injertos con microesferas cargadas con RA. De comportarse igual que en experimentos ya descritos (Crawford y Stocum, 1988a; Tamura *et al.*, 1997; Mercader *et al.*, 2000), los injertos tratados con RA, o al menos parte de sus células mesenquimales, deberían desplazarse a regiones más proximales.



#### IV. RESULTADOS

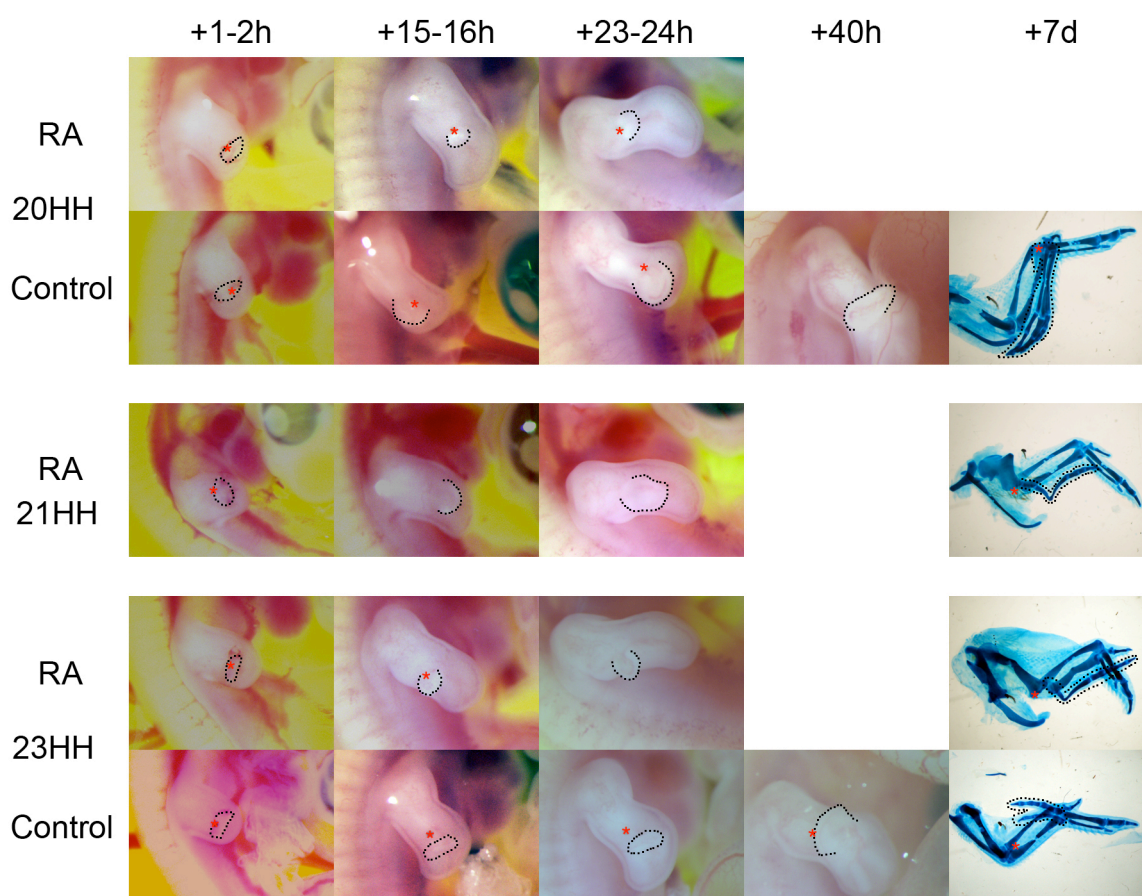
Así, en el caso de los injertos que llevaban microesferas tratadas con DMSO (controles,  $n=8$ ), dichas microesferas acababan siempre a lo largo de la mitad distal del zeugopodio o en la muñeca, al igual que el elemento esquelético más proximal del injerto. Sin embargo, en el caso de los injertos que llevaban microesferas tratadas con RA (0.1, 0.5 ó 1 mg/ml), un 81% de dichas microesferas acabaron en los alrededores del codo, acompañadas salvo en dos casos por el elemento esquelético más proximal del injerto ( $n=21$ , Tabla VI y Fig. R29c). Incluso se encontraron algunos casos en los que todo el bloque del injerto parecía hallarse cerca del codo (Fig. R29d, detalle en R29e). No obstante, una cuestión importante a tener en cuenta era que, si el desarrollo de la extremidad receptora se veía excesivamente afectado por RA, la proximalización observada podía ser más bien una ilusión óptica derivada de que el zeugopodio era más corto de lo normal. Por tanto, se reexaminaron los datos en busca de los casos en que el zeugopodio de la extremidad receptora no se hubiera visto afectado por el tratamiento. De los 9 especímenes localizados, 6 mostraban una clara proximalización, confirmando que no se trataba de un artefacto (Fig. R29e).

Para caracterizar mejor este fenómeno, se realizó un seguimiento temporal de la posición de los injertos con y sin microesferas de RA (Fig. R30). A tiempo final, parecía claro que de nuevo los injertos tratados con RA acababan en posiciones más proximales que los controles (Fig. R30, columna +7d). A tiempos cortos, las diferencias de posición entre ambos tipos de transplantes, no muy apreciables a las 15 htt, se hicieron sobre todo patentes a las 24 htt.



**Figura R29 (página anterior).** Evidencias de la existencia de un código de adhesión a lo largo del zeugopodio. **a – a''**, Ejemplos de trasplantes a futuro zeugopodio que al formar Z1 (**a**), Z3 (**a'**) o A1 (**a''**) terminaron en codo, zeugopodio distal o muñeca, respectivamente. **b – b''**, Ejemplos de trasplantes a región proximal del primordio, que independientemente de que formaran A1 (**b**), Z1 (**b'**) o Z3 (**b''**), terminaron unidos al estilopodio. En **b**, el injerto es de ala sobre pata. **c – e**, Injertos tratados con una microesfera de RA (asterisco). **c**, La hibridación *in situ* para el mensajero de *Tbx4* permitió identificar las células mesenquimales provenientes del trasplante. Así, mientras en el injerto control (detalle) todas las células del injerto se quedaron en la muñeca, las células del injerto tratado con RA formaron un reguero continuo hasta el codo. **d**, Ejemplo de trasplante en el que todo el bloque del injerto parecía desplazarse hacia el codo. **e**, Ejemplos de trasplantes en los que, pese a que el zeugopodio del receptor no se vio afectado, se observó una clara proximalización de la microesfera y el elemento esquelético proximal del injerto. En el espécimen del detalle, todo el bloque del injerto resultó desplazado, no sólo las células mesenquimales.

En todos los casos, las líneas punteadas delimitan el extremo proximal del injerto. S, Z y A señalan el estilopodio, zeugopodio y autopodio de la extremidad receptora, respectivamente.

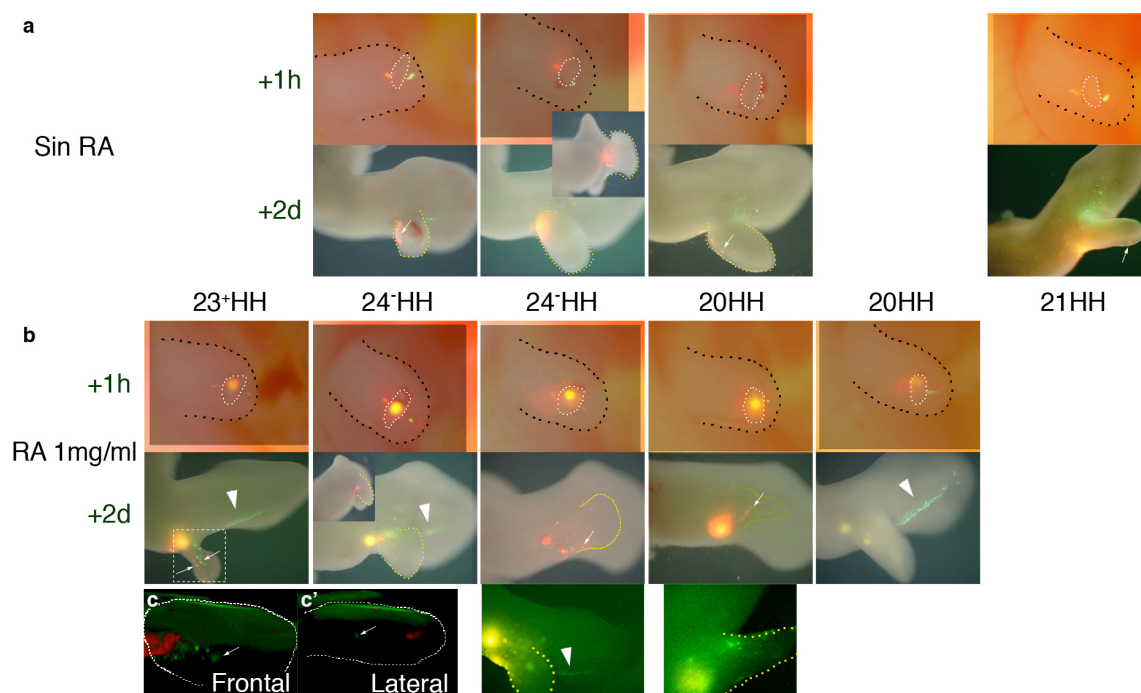


**Figura R30.** Seguimiento temporal de trasplantes a futuro zeugopodio, con y sin RA. En la región izquierda se indican el estadio del donante así como si el trasplante estaba tratado con microesfera control o impregnada en RA. En la parte superior se indica el tiempo transcurrido tras la operación. Los trasplantes están perfilados por líneas punteadas. La posición de las microesferas está señalada con un asterisco en aquellas imágenes en que eran claramente visibles. La ausencia de algunos paneles se debe a que el trasplante no progresó bien (HH20+RA), o a que el receptor estaba demasiado girado dentro del huevo como para poder fotografiarlo. Nótese que la microesfera control de HH23 se separó del injerto, y acabó en una posición muy proximal, lejos de dicho injerto.

Si bien el movimiento de las células mesenquimales no parecía requerir un mecanismo excesivamente complejo, resultaba difícil imaginar uno por el cual todo el injerto, incluyendo el ectodermo, experimentara un desplazamiento neto. La idea más extendida es que el ectodermo es más rígido que el mesodermo, menos propenso que éste a reorganizaciones, y por tanto no era fácil vislumbrar cómo, una vez cerrada la herida, el ectodermo de la extremidad receptora permitiría el movimiento del injerto. Para distinguir entre los diversos posibles mecanismos (ver

#### IV. RESULTADOS

Discusión), se decidió repetir el experimento de seguimiento temporal, pero marcando con colorantes lipofílicos el ectodermo situado inmediatamente distal (DiO, colorante verde) y proximal (Dil, rojo) a la herida. El marcaje se realizó después de hacer la herida pero antes de colocar el injerto, para evitar que éste recibiera trazas del colorante. La primera observación relevante es que tanto en los injertos control (Fig. R31a) como en los tratados (Fig. R31b), la marca proximal, y a veces la distal, tenía cierta presencia dentro del transplante (flechas en los paneles de +2días). Al analizar alguno de los especímenes mediante microscopía confocal, se vio que en ocasiones esas células eran mesenquimales (flecha en Figura R31c y c'), lo que probablemente significaba que al marcar el ectodermo, parte del colorante sobrante había entrado a la herida, marcando células mesenquimales. En cualquier caso, también se encontraron células que sólo eran ectodérmicas (células rojas en Figura R31c y c'), lo que sólo podía ocurrir si parte del ectodermo de la extremidad receptora estaba siendo reclutado como ectodermo del transplante, probablemente durante el proceso de cierre de la herida. La segunda observación fue que el comportamiento de la marca distal era muy distinto entre los injertos control y los tratados con RA. En estos últimos, la marca final resultó ser mucho más alargada (n=4/5, puntas de flecha en Figura R31b, comparar con a). Esto sugería que el desplazamiento relativo del injerto respecto de la región distal era mayor cuando se trataban con RA que cuando no se trataban (ver Discusión sobre los posibles mecanismos).



**Figura R31.** Los injertos tratados con RA experimentan un cambio de posición relativa. **a** y **b**, Cada columna muestra los dos injertos de un mismo embrión del estadio indicado. En la parte superior (**a**) aparecen los injertos no tratados, y en la inferior los que llevaban una microesfera de RA. Para cada condición se muestran imágenes de campo claro y de fluorescencia de 1 hora (+1h) o 2 días (+2d) tras la operación. En los paneles +1h, la línea discontinua negra perfila la extremidad receptora, y la punteada blanca rodea el transplante. En los paneles de +2d, el transplante está rodeado por una línea punteada amarilla. Las flechas señalan células fluorescentes presentes en el transplante. Las puntas de flecha en **b** señalan las marcas verdes mucho más alargadas de lo normal. **c** y **c'**, reconstrucción 3D del espécimen enmarcado en **b**, en visión frontal (**c**) y lateral (**c'**) del transplante. La misma célula verde mesenquimal está señalada con una flecha en ambos paneles. Todas las rojas parecían estar en superficie. Los paneles ausentes se deben a la muerte del espécimen en cuestión.



IV.4.3 Efecto de la sobreexpresión de *Meis2* en el linaje *Shh*.

Los cambios en el comportamiento celular observados al sobreexpresar *Meis2* aleatoriamente tenían que ser debidos, directa o indirectamente, a la regulación transcripcional provocada por *Meis2* en las regiones donde normalmente no se expresa. Para identificar cuáles eran esos cambios en el primordio de extremidad, lo mejor era poder sobreexpresarlo en una región concreta del primordio que fuera fácil de aislar, y obtener RNA de dicha región. La estrategia de expresión aleatoria no era buena para ese tipo de abordaje. Por tanto, se hizo uso de la línea *Shh*<sup>GFP<sup>Cre</sup>/+</sup> (Harfe *et al.*, 2004), combinada con la R26R*Meis2a*-IRES-EYFP, para sobreexpresar *Meis2* en las células pertenecientes al linaje de *Sonic hedgehog* (*Shh*). La ventaja de este abordaje es que dicho linaje queda confinado a una región bastante concreta de la extremidad (Harfe *et al.*, 2004), fácilmente identificable debido a la fluorescencia de la EYFP, y por tanto fácil de aislar.

Antes de comenzar el análisis transcriptómico, se estudió el fenotipo derivado de la sobreexpresión de *Meis2*, por ver si el comportamiento celular era similar al observado con la sobreexpresión aleatoria. Se analizó la apariencia del tejido blando y el patrón esquelético a distintos estadios de desarrollo, con una o en ocasiones dos copias del alelo R26R*Meis2a*. Como controles para la comparación, se utilizaron embriones provenientes de cruces de individuos *Shh*<sup>GFP<sup>Cre</sup>/+</sup> con individuos R26REYFP (Fig. R32a), o hermanos de camada con el alelo R26R*Meis2a* pero sin el *Shh*GFP<sup>Cre</sup>. A E11.5 ya se apreciaba cierta diferencia sutil en la forma del primordio, y a E13.5 se observaba claramente que los elementos posteriores del autopodio estaban afectados (detalle en Figura R32b y c). A E15.5 se confirmó que sobre todo el dedo 5 estaba peor desarrollado que el resto, o casi ausente (sobre todo en la extremidad inferior), dependiendo de la dosis del alelo R26R*Meis2a* (Fig. R32b, c y f). También llamaba la atención, especialmente en el caso de doble copia del alelo, que las células fluorescentes tendían a acumularse en la zona proximal del autopodio (Fig. R32c), provocando un sobrecrecimiento muy notable en esa región en algunos individuos adultos (Fig. R32n). Las tinciones esqueléticas desde E14.5 hasta la edad adulta revelaron un fenotipo 100% penetrante, pero de expresividad variable. Los defectos más comúnmente observados fueron: retraso y atrofia de las falanges de los dedos 4 y sobre todo el 5 (Fig. R32d y k), metacarpos 4 y 5 dismórficos y el 5 en ocasiones aparentemente dividido en dos fragmentos (Fig. R32e), huesos del tobillo y de la muñeca desplazados y/o fusionados, lo que afectaba al nivel de anclaje del metacarpo/metatarso 5 (Fig. R32f – i, l – m), osificación asimétrica de los metacarpos/metatarsos 4 y 5 (Fig. R32g), pequeños elementos óseos ectópicos en las articulaciones (Fig. R32m) y sindactilia de tejido blando entre los dedos 3 y 4 (Fig. R32j). Con muy baja frecuencia, se observaron deformaciones en elementos del zeugopodio (Fig. R32h, n=2 de 120 extremidades analizadas) y falanges ectópicas asociadas al metacarpo5 (Fig. R32i, n=1 de 120).

**Figura R32 (página siguiente).** Fenotipo de los individuos *Shh*<sup>GFP<sup>Cre</sup>/+</sup>; R26R*Meis2a*. **a – c**, Imágenes de epifluorescencia de embriones de E15.5 y E13.5 (detalles) con las siguientes variantes del locus R26R: EYFP/+ (**a**), *Meis2a*/+ (**b**), *Meis2a*/*Meis2a* (**c**). Los números romanos se refieren a la identidad de cada dígito (blanco para FL y amarillo para HL). La punta de flecha señala defectos en el dedo 5. **d – n**, comparación del fenotipo entre individuos control (izquierda en cada panel salvo el **n**, donde está arriba) y mutantes (derecha en cada panel, salvo el **n**, donde está abajo). Las puntas de flecha señalan en general defectos asociados al dedo 5, ya sea falanges o metacarpo, aunque en **m** señalan elementos óseos ectópicos o sobrecrecidos, y en **n** apunta a la acumulación de tejido en la zona posterior proximal del autopodio. Las flechas señalan en general los elementos desplazados y/o fusionados, salvo en **j**, donde apunta a la sindactilia observada. Los asteriscos señalan defectos en los metacarpos/metatarsos posteriores, ya sea en su forma (**h**, **i**, **l**, **m**), o en la osificación (**g**). Los estadios presentados son: E14.5 (**d**, teñidos por CG Arques), E15.5 (**e**, **f**, una copia de R26RM2a; **h**, **i**, dos copias), E17.5 (**g**) e individuos adultos (**j** – **n**). La perspectiva es dorsal salvo en **j** (ventral) y **k** (posterior). **d**, **e**, **h**, **k**, **l**, **n** son FL, y el resto HL. P1, P2, P3= falanges 1, 2, 3. ti=tibiale, ul=ulnare, ce=centrale (navicular). 1, 2, 3, 4/5=carpos/tarsos distales.

#### IV. RESULTADOS



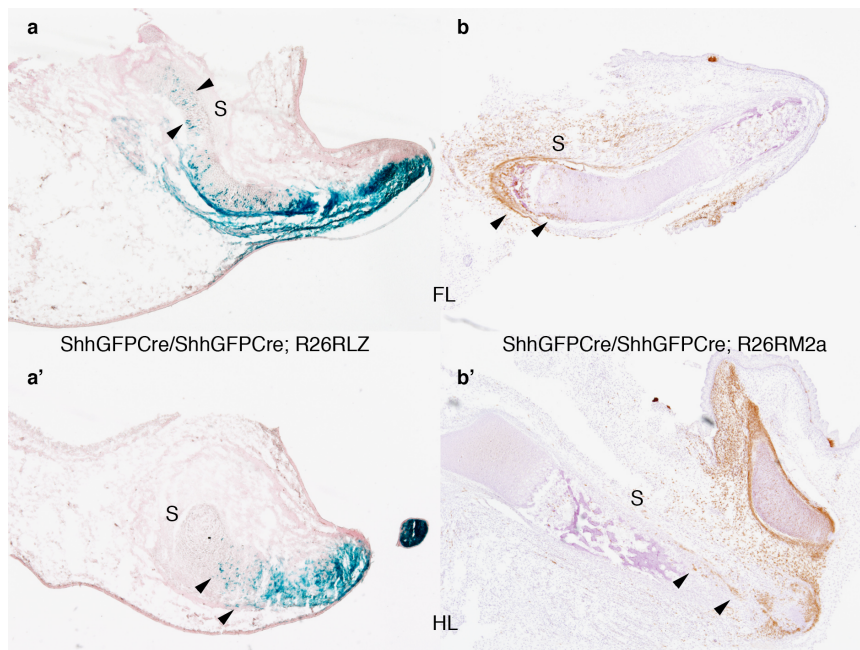
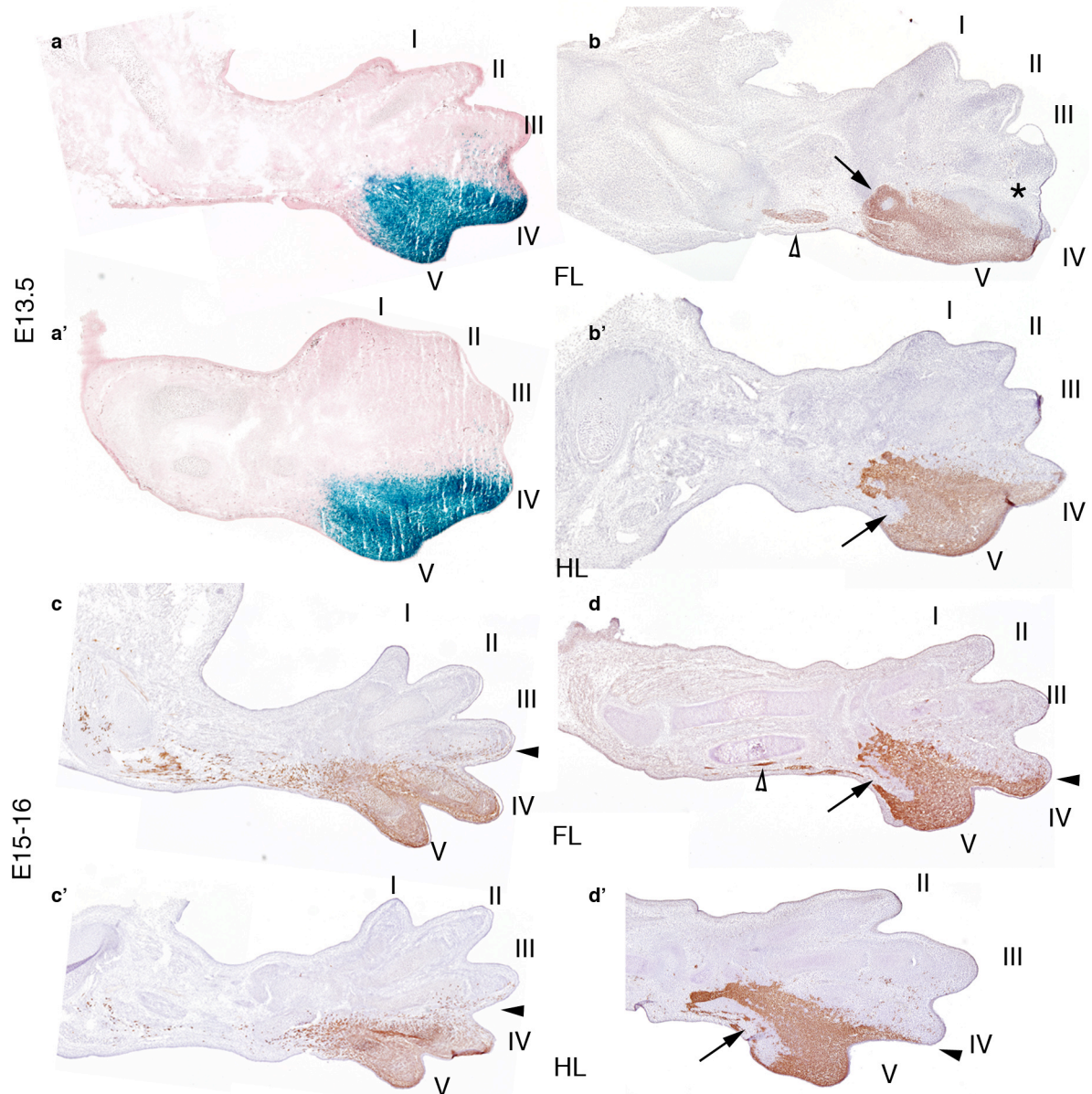
El fenotipo observado (elementos deformados y desplazados, elementos ectópicos, acumulación de tejido en una región) sugería que estaba operando un cambio en las propiedades de adhesión celular. Para comprobarlo, se analizó a nivel histológico la contribución del linaje de células que expresaban *Shh*, en condiciones control o de sobreexpresión de *Meis2*. Coincidiendo con lo que estaba publicado (Harfe *et al.*, 2004), el linaje de las células que habían expresado *Shh* se extendía mayoritariamente por los dedos 4 y 5 de las extremidades control, con una contribución variable de unas pocas células a la parte posterior del dedo 3, sobre todo en estadios más avanzados (Fig. R33a y a', c y c'). Sin embargo, cuando sobreexpresaban *Meis2*, la contribución del grueso de las células del linaje *Shh* no sobrepasaba la mitad del dedo 4 en ningún estadio analizado, siendo esto especialmente patente en las extremidades con dos



copias del alelo R26RMeis2a (Fig. R33 b y b', d y d'). Es más, en lugar de una distribución tipo “sal y pimienta”, como la que mostraban las células del control especialmente en los límites del dominio (Fig. R33c y c'), las células que sobreexpresaban *Meis2* tendían a formar dominios compactos, con pocas células entremezclándose con otras no pertenecientes al linaje (comparar densidad del marcaje entre las columnas izquierda y derecha de la Figura R33). Además, se observaron comportamientos aberrantes, como la formación de huecos (Fig. R33d y d'), que en algunas secciones llegaban a formar “islas” de células no pertenecientes al linaje *Shh* (silvestres y de carácter distal, por tanto), rodeadas por células que sobreexpresaban *Meis2*. Este comportamiento tipo “agua y aceite” recordaba mucho a los ensayos de adhesión diferencial en los que células de carácter proximal y distal eran capaces, en cultivo, de formar grupos aislados unos de otros (Barna y Niswander, 2007), y a los experimentos de regeneración en que blastemas proximales eran capaces de envolver (*engulf*) blastemas distales (Nardi y Stocum, 1984). También se observaron grupos en los que ocurría al contrario, las células que sobreexpresaban *Meis2* formaban grupos aislados, sobre todo a lo largo del zeugopodio (puntas de flecha abiertas en Figura R33b y d). En el autopodio, lo que aparentemente eran grupos aislados en realidad eran las últimas estribaciones del dominio principal, como se pudo comprobar al analizar varias secciones consecutivas. Así pues, de nuevo parecía que *Meis2* estaba provocando un cambio en las propiedades de adhesión. No obstante, de comportarse igual que en la sobreexpresión aleatoria, uno de los fenómenos esperados era la relocalización de algunas de las células hacia la zona proximal, fenómeno que no se observó (no se encontraron células marcadas en el estilopodio). Una de las posibles causas es que las células en las que se está sobreexpresando *Meis2* son aquellas que expresaron *Shh* durante cierto tiempo. A *Shh* se le ha atribuido recientemente cierto carácter distalizante (Aimée Zuñiga, no publicado), algo ya descrito en *Drosophila* (Gonzalez-Crespo *et al.*, 1998), por lo que podría ocurrir que la expresión de *Meis2* no sea suficiente para inducir la proximalización en células que expresan *Shh*. Por tanto, se generaron individuos *Shh*<sup>GFPCre/GFPCre</sup>, con falta de función de *Shh*, combinados bien con el alelo testigo del locus Rosa26, o con el que sobreexpresa *Meis2*. Resultó que en el mutante de *Shh* la contribución de su linaje es mucho más proximal que en condiciones silvestres (Fig. R34a y a'), por lo que al sobreexpresar *Meis2*, dicha contribución proximal no pudo atribuirse a la expresión de *Meis2* sino a la falta de *Shh* (Fig. R34b y b'). Otras posibles explicaciones serán tratadas más adelante (ver Discusión).

**Figura R33 (página siguiente).** Análisis histológico del linaje *Shh* en condiciones silvestres (a, a', c, c') y de sobreexpresión de *Meis2* (b, b', d, d'). a y a' son secciones de individuos teñidos para LacZ, contrateñidas con rojo neutro. El resto son inmunohistoquímicas para GFP, contrateñidas con hematoxilina diferenciada. Se muestran una extremidad superior y una inferior de dos etapas distintas del desarrollo para cada condición, según se indica. Las extremidades tenían una sola copia del alelo R26RMeis2a, salvo en b.

La orientación de las secciones es: proximal a la izquierda y anterior arriba. Los números romanos indican la identidad de los dedos. Las flechas señalan las regiones donde se formaban huecos dentro del linaje *Shh*. Las puntas de flecha rellenas señalan el límite anterior de la contribución del linaje *Shh*. Las puntas de flecha huecas señalan los ocasionales grupos aislados de células *Meis2* en el zeugopodio. El asterisco señala la ausencia de células *Meis2* en la región posterior del dedo3 del individuo con dos copias del alelo de sobreexpresión (b).



**Figura R34.** La pérdida de función de SHH causa una proximalización de las células de su linaje. **a** y **a'**, Cortes de extremidades *Shh<sup>GFP-Cre</sup>/GFP-Cre*; R26RLZ, teñidas para LacZ y contrañidas con rojo neutro. **b** y **b'**, Tinción anti-GFP en secciones de extremidades *Shh<sup>GFP-Cre</sup>/GFP-Cre*; R26RM2a. Las puntas de flecha señalan células marcadas en el estilopodio (S). El eje P-D discurre de izquierda a derecha. FL, HL indican extremidad superior e inferior, respectivamente.

#### IV.4.4 Comparación transcriptómica entre células silvestres y Meis2 pertenecientes al linaje *Shh*.

Una vez comprobado que la sobreexpresión de *Meis2* tenía un efecto sobre el linaje de las células que expresaban *Shh*, se procedió a realizar una comparación transcriptómica de esa región (identificada *in situ* a E11.5 gracias a su fluorescencia, ver Materiales y Métodos) entre individuos control e individuos con una o dos copias del alelo R26RMeis2a. Se usaron *microarrays* de la compañía Agilent. Tras el filtrado habitual (ver Materiales y Métodos), la lista de genes cuya expresión variaba significativamente se redujo, en el caso de la comparación entre los individuos con dos copias del alelo R26RMeis2a y los individuos control, a unos 60 candidatos (no incluyendo los genes predichos de existencia no comprobada). La comparación una copia vs control dio lugar a sólo 8 candidatos, contenidos dentro de la lista antes mencionada. La comparación dos copias vs una copia no dio lugar a candidatos que variaran significativamente. La Tabla VII resume los valores de *fold change* (FC, cambio relativo de expresión) y p-valores corregidos (ver Materiales y Métodos), así como la información existente en la literatura para los mencionados candidatos.

Símbolo	Nombre	log FC 1 copia vs Control	log FC 2 copias vs Control	Corr p-value 2 copias vs Control	Descripción	Expresión en extremidad
<b>EXPRESIÓN AUMENTADA</b>						
Defcr-rs2	defensin related cryptdin, related sequence 2	0,55	4,62	0,0150	Resp. inmune innata (epit. intest)	
Defcr-rs10	defensin related cryptdin, related sequence 10	0,76	4,03	0,0130	Resp. inmune innata (epit. intest)	
Masp2	mannan-binding lectin serine peptidase 2	3,82	3,96	0,0005	Respuesta inmune innata	
Gpx6	glutathione peroxidase 6	1,98	3,08	0,0202	Respuesta a estrés oxidativo	pericondrio
Nefm	neurofilament, medium polypeptide	2,09	2,45	0,0021	Organización citoesqueleto	
Hddc3	HD domain containing 3	1,43	2,45	0,0016	Asociada a membrana. Hidrólisis enlace fosfórico	
Cyp1b1	cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1	2,44	2,43	0,0008	Oxidorreductasa. CytP450	dominios A y P
Itga9	integrin alpha 9	0,58	2,26	0,0011	Prot. de membrana. Adhesión celular, señalización	
Defcr3	defensin related cryptdin 3	1,16	2,20	0,0196	Respuesta Inmune (criptas intestinales)	
Pnpla3	patatin-like phospholipase domain containing 3	1,40	2,19	0,0234	Fosfolipasa de membrana	
Piwi4	piwi-like homolog 4	1,89	2,13	0,0449	Espermatogénesis	
Ntn4	netrin 4	1,87	2,07	0,0130	Membrana basal, guía axonal	dedo/interdígito
Tnfrsf14	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14	2,86	1,98	0,0165	Respuesta inmune mediada por células T	
Adamts8	a disintegrin-like and metallo-peptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 8	1,94	1,96	0,0413	Metaloproteinasas extracelular	interdígito HL



#### IV. RESULTADOS

Pdlim3	PDZ and LIM domain 3	1,59	1,77	0,0196	Organización de filamentos de actina	
Fbp1	fructose biphosphatase 1	2,11	1,72	0,0353	Metabolismo de fructosa y manosa	
Ywhaz	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	1,31	1,65	0,0078	Expresión histamina por mastocitos	ZPA (muy débil)
Padi2	peptidyl arginine deiminase, type II	1,43	1,62	0,0130	Hidrolasa	
Dmrta1	doublesex and mab-3 related transcription factor like family A1	1,02	1,54	0,0450	ZF. Diferenciación sexual	
Dct	dopachrome tautomerase	1,23	1,54	0,0237	Producción de melanina	Elementos esqueléticos
Crebzf	CREB/ATF bZIP transcription factor	0,77	1,48	0,0214	TF en retina	Alrededor metatarsos
Nefl	neurofilament, light polypeptide	1,23	1,44	0,0380	Organización del citoesqueleto en neurofilamentos	Alrededor metatarsos
Pick1	protein that interacts with C kinase 1	1,43	1,44	0,0196	Espermatogénesis	
Ccdc85a	coiled-coil domain containing 85A	1,11	1,23	0,0449	coiled coil domain	
Brd8	bromodomain containing 8	0,91	1,16	0,0449	Modificación de cromatina	
Matn2	matrilin 2	0,98	1,13	0,0382	Matriz extracelular, maduración de elementos esqueléticos	Articulaciones, pericondrio
<b>EXPRESIÓN DISMINUIDA</b>						
Ero1lb	ERO1-like $\beta$	-0,71	-1,18	0,0003	Oxidorreductasa	
Soat1	sterol O-acyltransferase 1	-0,61	-1,18	0,0004	Biosíntesis de esteroides	
Serhl	serine hydrolase-like	-0,35	-1,21	0,0005	Hidrolasa de mitocondria y peroxidasa	
Ropn1l	ropporin 1-like	-0,42	-1,22	0,0005	Expresión en células germinales, testículos	
Eps8	epidermal growth factor receptor pathway substrate 8	-1,49	-1,24	0,0003	Organización de filamentos de actina	condens/músculo
Ablim1	actin-binding LIM protein 1	-1,10	-1,25	0,0002	Unión a actina	
Serpinb10	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 10	-1,08	-1,25	0,0006	Inhibidor de Ser-proteasa	
Lym7	LYR motif containing 7	-1,49	-1,26	0,0002	Componente mitocondrial	
Vps13b	vacuolar protein sorting 13B	-0,81	-1,32	0,0002	Proteína transmembrana de expresión ubicua	
Ddc8	differential display clone 8	-0,22	-1,32	0,0005	Nested gene in TIMP-2	
D14Ert449e	DNA segment, Chr 14, ERATO Doi 449, expressed	-1,13	-1,34	0,0001	Proteína transmembrana	Alrededor condensaciones
Zfr	zinc finger RNA binding protein	-0,90	-1,37	0,0002	Espermatogénesis	Difusa
Fzd6	frizzled homolog 6	-0,57	-1,38	0,0001	Receptor de Wnt	condens/músculo

#### IV. RESULTADOS

Mxra7	matrix-remodelling associated 7	-0,54	-1,39	0,0005	Prot. de membrana. Remodelación de matriz	
Lmo4	LIM domain only 4	-1,00	-1,43	0,0006	Secuestra HDAC, patrón esquelético	mesénquima dorsal
Tmod4	tropomodulin 4	-1,31	-1,44	0,0005	Unión a actina	
Ctse	cathepsin E	-1,54	-1,73	0,0001	Defensa inmune, adhesión celular en macrófagos	Pericondrio
Hist1h4i	histone cluster 1, H4i	-0,61	-1,77	0,0001	Respuesta inmune	Dedos?
Fbxo44	F-box protein 44	-1,87	-1,87	0,0004	Ubiquitin-ligasa de glicoproteínas	Alrededor dedos?
Jmjd6	jumonji domain containing 6	-0,97	-1,94	0,0000	Receptor de P-Serina	Condensaciones en desarrollo
Gpr98	G protein-coupled receptor 98	-1,27	-2,01	0,0003	Proteína de membrana: estereocilios	
Rab6b	RAB6B, member RAS oncogene family	-1,62	-2,21	0,0000	GTPasa tipo Ras	
Rnasen	ribonuclease III, nuclear	-1,49	-2,44	0,0000	Procesamiento de miRNAs	Articulaciones
Depdc6	DEP domain containing 6	-0,37	-2,53	0,0002	Interacción con mTOR	Músculo
Tia1	cytotoxic granule-associated RNA binding protein 1	-0,86	-2,55	0,0000	Respuesta inmune	
Leap2	Liver-expressed antimicrobial peptide 2	-2,32	-2,79	0,0000	Defensa extracelular contra bacterias	Músculo
Slc15a2	solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2	-2,51	-2,96	0,0002	transportador H <sup>+</sup> /péptidos	
Zmym4	zinc finger, MYM-type 4	-2,75	-2,99	0,0000	RNA inhibidor de muerte celular	
Zbp1	Z-DNA binding protein 1	-3,12	-3,13	0,0001	Respuesta inmune a DNA	
Tcfap2e	transcription factor AP-2, epsilon	-2,89	-3,43	0,0000	TF, desarrollo bulbo olfatorio	Condensaciones?
Zfp192	zinc finger protein 192	-1,25	-3,53	0,0001	Familia Kruppel. Expresión en riñón	
Col4a6	procollagen, type IV, alpha 6	-1,85	-3,62	0,0005	Matriz extracelular	Condensaciones

**Tabla VII.** Principales genes candidatos a ser dianas de *Meis2*. Además del símbolo y el nombre del gen y de los parámetros típicos de los *microarrays* (logFC, p-valor corregido), se incluye una breve descripción del tipo de proteína codificada y/o su función, así como la expresión descrita en el primordio de extremidad, de existir la información. El código de colores es: respuesta inmune (naranja), organización o unión al citoesqueleto (verde), proteínas de membrana, adhesión y/o señalización (azul oscuro), diferenciación sexual, espermatogénesis (amarillo), constituyentes de matriz extracelular (violeta), oxidorreducción (rojo), relacionados con muerte celular programada (gris), y otras categorías (azul claro). Para los genes cuya expresión está descrita en artículos de investigación, se utilizó la base datos de MGI (<http://www.informatics.jax.org/expression.shtml>) y para aquellos cuya expresión no está expresamente descrita, se recurrió a la base de datos Gene Paint ([www.genepaint.org](http://www.genepaint.org)). Es destacable que no pudo realizarse el control de validación del experimento, que sería ver *Meis2* en los genes de expresión aumentada, porque la sonda del *microarray* no reconocía la parte codificante, que era la que se estaba sobreexpresando.

Los 26 genes con expresión aumentada podían agruparse de acuerdo a las siguientes categorías, según la función de su producto codificado (ver Figura R35a):

- Respuesta inmune. Especialmente innata (concretamente las criptidinas o alfa-defensinas son producidas por las células de Paneth en el intestino delgado (Eisenhauer *et al.*, 1992)). También



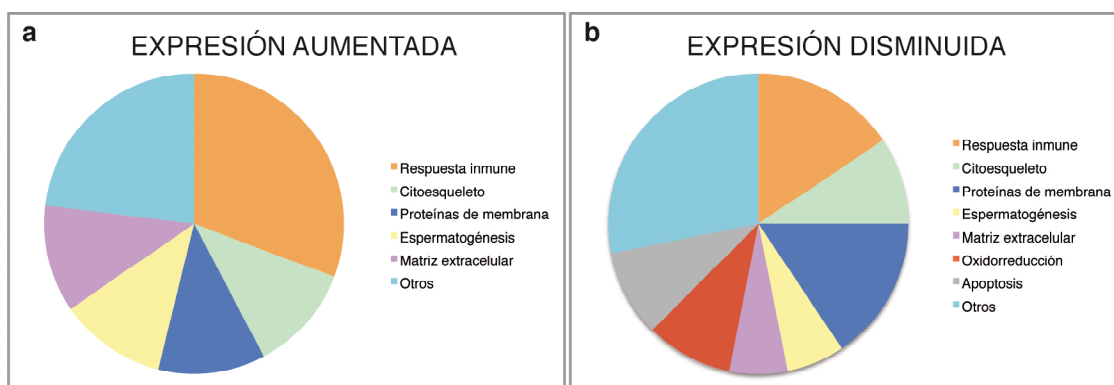
#### IV. RESULTADOS

respuesta a estrés oxidativo y metabolismo de la manosa (que participa en la modulación de la respuesta inflamatoria mediada por macrófagos): 8 genes.

- Organización o unión al citoesqueleto (sobre todo de actina): 3 genes.
- Proteínas asociadas a membrana (adhesión y/o señalización): 3 genes.
- Diferenciación sexual, espermatogénesis: 3 genes.
- Remodelación o constituyentes de matriz extracelular: 3 genes.
- Otras: 6 genes.

En cuanto a los 32 de expresión disminuida (Fig. R35b):

- Espermatogénesis: 2 genes
- Oxidoreducción, asociación con mitocondrias o peroxisomas: 3 genes.
- Proteínas asociadas a membrana (señalización o transporte transmembrana): 5 genes.
- Remodelación o constituyentes de matriz extracelular: 2 genes
- Organización o unión al citoesqueleto: 3 genes.
- Respuesta inmune: 5 genes.
- Relación con muerte celular programada (inhibición o inducción): 3 genes.
- Otras: 9 genes.



**Figura R35.** Clasificación de los candidatos del experimento de *microarrays*. **a**, Genes de expresión aumentada al sobreexpresar *Meis2*. **b**, Genes de expresión disminuida. El código de colores es el mismo que en la Tabla VII.

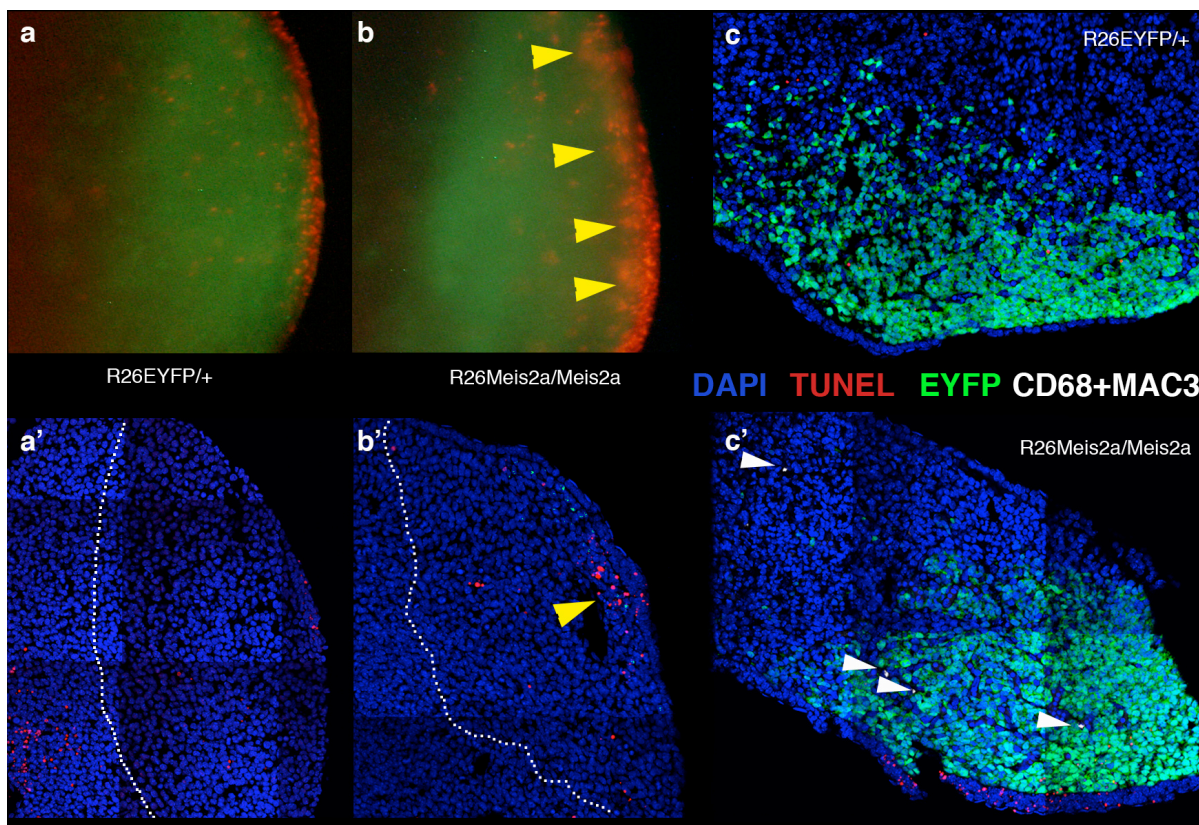
Así pues, si se reducía la lista a las categorías de genes con más probabilidades de estar involucradas directamente en el fenotipo (ver apartado V.3.2), y se filtraban de acuerdo a la expresión descrita en el primordio de extremidad, éstos eran los candidatos a analizar:

- Marcadores de respuesta inmune innata (macrófagos fundamentalmente)
- Proteínas de membrana: *D14Ert449e*, *Itga9*.
- Proteínas de ECM: *Adamts8*, *Matn2*, *Ntn4* y *Col4a6*.
- Modificación de cromatina: *Brd8* y *Lmo4*.

*Itga9* se incluyó en la lista reducida porque aunque no se había descrito su expresión en el primordio de extremidad, era el único candidato de la lista completa más directamente involucrado en propiedades de adhesión (codificaba una integrina).

Llamaba la atención que con este abordaje la muerte celular pudiera estar jugando un papel importante, ya que en la sobreexpresión aleatoria no parecía ser el caso (Fig. R27). Por tanto, se analizó tanto la distribución de células apoptóticas como de marcadores de macrófagos (posibles causantes de la putativa muerte celular) en secciones de primordios de extremidad de E11.5 – E12. Mientras que en el caso control sólo se observaron los dominios típicos de muerte celular programada (Milaire, 1971,1977; Fernandez-Teran *et al.*, 2006) (Fig. R36a y a', n=18

extremidades enteras y 6 en secciones), en la mayoría de las extremidades que sobreexpresaban *Meis2* se encontró una acumulación anómala de células apoptóticas dentro de la zona de sobreexpresión, destacando la formación de grupos en la región más cercana al ectodermo (Fig. R36b y b', n=10/14 extremidades enteras y 5/6 en secciones). En cuanto a los macrófagos, si bien en ninguno de los casos se cuantificó un número muy alto, sí se observó cierto reclutamiento en las extremidades experimentales (Fig. R36c y c'). A una conclusión similar se llegó analizando la expresión de un marcador más general de células fagocíticas (Fig. S7). Por el momento se desconocen las implicaciones de estos datos (ver Discusión).

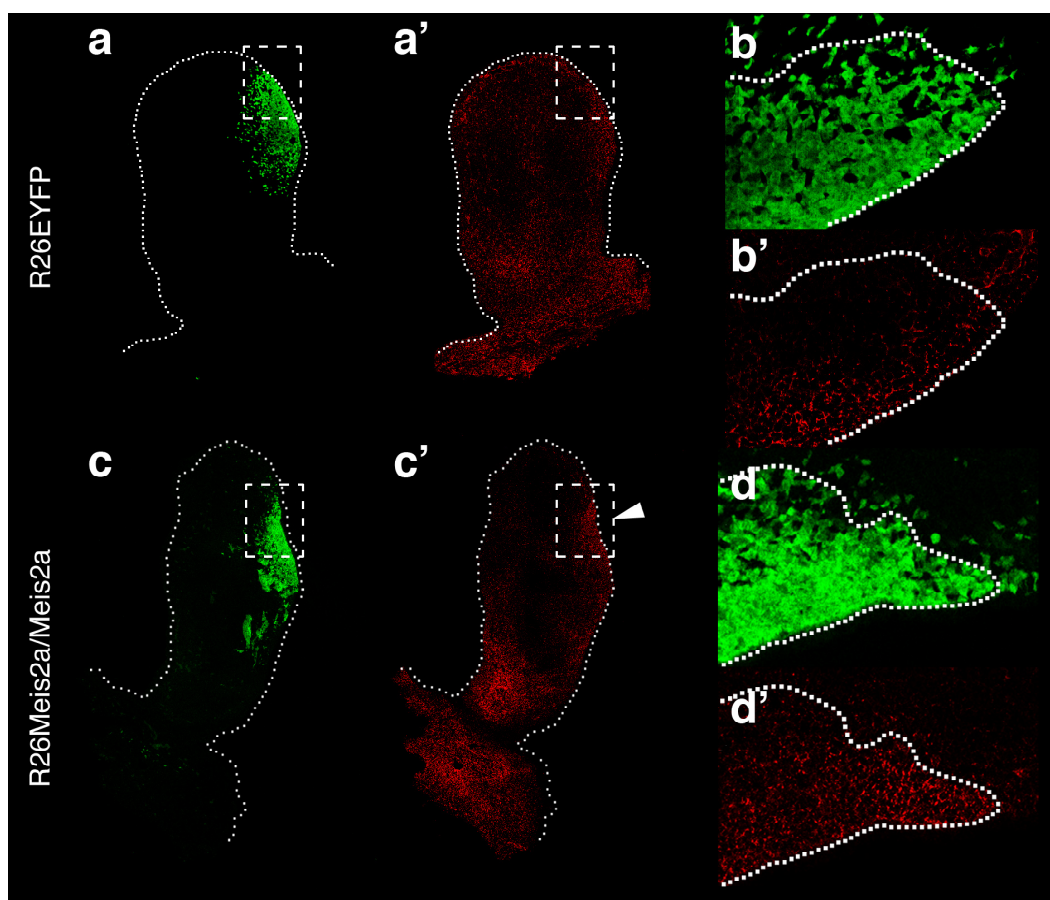


**Figura R36.** La sobreexpresión de *Meis2* provoca un aumento regional de la frecuencia de muerte celular y un reclutamiento moderado de macrófagos. **a – b'**, Fotografías de tinción TUNEL (rojo) y anti-GFP (verde) en extremidades completas (**a y b**) y en secciones confocales (**a' y b'**). En las extremidades control (**a y a'**), los dominios de muerte celular observados son los esperados para el estadio analizado: un dominio central, similar al parche opaco de pollo (visible en **a'**, izquierda), y un dominio anterior, menos definido (no mostrado). En el linaje *Shh* (línea quebrada blanca) se detectó una media de 1.85 células apoptóticas (sd=2.02, n=41 secciones de 3 extremidades superiores y 3 inferiores). Al sobreexpresar *Meis2* (**b y b'**), además de los dominios normales de muerte, se apreció un aumento general del número de células apoptóticas en el linaje *Shh* (media±sd=12.24±9.3, valor p de la prueba t no pareada <0.0001, n=42 secciones de 3 extremidades superiores y 3 inferiores), con tendencia a formar grupos en dominios adyacentes al ectodermo (puntas de flecha amarillas). **c y c'**, Ejemplos de secciones de una extremidad control (**c**) y otra que sobreexpresa *Meis2* (**c'**), en los que además de tinción EYFP y TUNEL, se inmunodetectó la presencia de CD68 y MAC3, como marcadores de macrófagos (puntas de flecha blancas). En 33 secciones de 4 extremidades control (2 superiores y 2 inferiores) se cuantificaron 2 células positivas fuera de la región positiva para GFP (media±sd=0.06±0.24), y ninguna dentro del linaje *Shh*. En 34 secciones de 4 extremidades experimentales (2 superiores y 2 inferiores), se contaron 8 células positivas dentro de la zona positiva para GFP o en su periferia (media±sd=0.24±0.61, p=0.0292), y otras 10 en regiones alejadas de esa zona (media±sd=0.29±0.68, p=0.0657). El panel **c'** no es representativo de la media de células marcadas por sección, pero sirve como ejemplo de las posibles localizaciones de los macrófagos. Se concluyó por tanto que se estaba produciendo un reclutamiento moderado pero significativo de macrófagos a la zona de sobreexpresión de *Meis2*.

#### IV. RESULTADOS

El papel que la remodelación de la matriz extracelular puede tener en procesos morfogénicos durante el desarrollo de la extremidad se ha estudiado recientemente para algunas metaloproteinasas de la familia ADAMTS y el componente que degradan, el versicano (McCulloch *et al.*, 2009; Capehart, 2010; Hudson *et al.*, 2010). Por tanto, teniendo en cuenta que *Adamts8* era uno de las posibles dianas con expresión aumentada, se estudió el patrón de expresión de su RNA mensajero en extremidades control y experimentales de E11.5. Desafortunadamente, o bien no se expresaba en ninguna de las condiciones analizadas a ese estadio (la expresión que aparece en las bases de datos es a E14.5), o bien la relación señal/fondo de la hibridación *in situ* impedía detectar su expresión (datos no mostrados). La expresión de los otros componentes de matriz seleccionados no se ha estudiado todavía.

De las proteínas de membrana, la única que se estudió hasta el momento de escribir esta tesis fue ITGA9. La inmunolocalización en secciones de E11.5–E12 reveló que, en extremidades control, ITGA9 se expresa fundamentalmente en la zona proximal, y en algunas regiones subectodérmicas a lo largo de todo el eje P-D (Fig. R37a – b'). Al sobreexpresar *Meis2*, se observó que en algunas secciones ITGA9 se expresaba en una región posterior y distal, coincidente con la sobreexpresión de *Meis2* (Fig. R37 c – d'). No obstante, llamaba la atención que no en todas las secciones se veía una correlación tan clara, y en las que se veía, no parecía que el dominio de expresión ectópico de ITGA9 se extendiera tanto como el dominio de expresión de GFP (comparar Figura R37c y c'). Esto invitaba a pensar que además de la presencia de MEIS2, se requerían otro tipo de señales regionales para inducir la expresión de ITGA9. En cualquier caso, la fuerte expresión de ITGA9 en la región proximal de la extremidad no se había descrito anteriormente y podía sugerir, junto con los datos de los *microarrays*, que ITGA9 es una de las moléculas de adhesión que participan en el fenotipo observado.

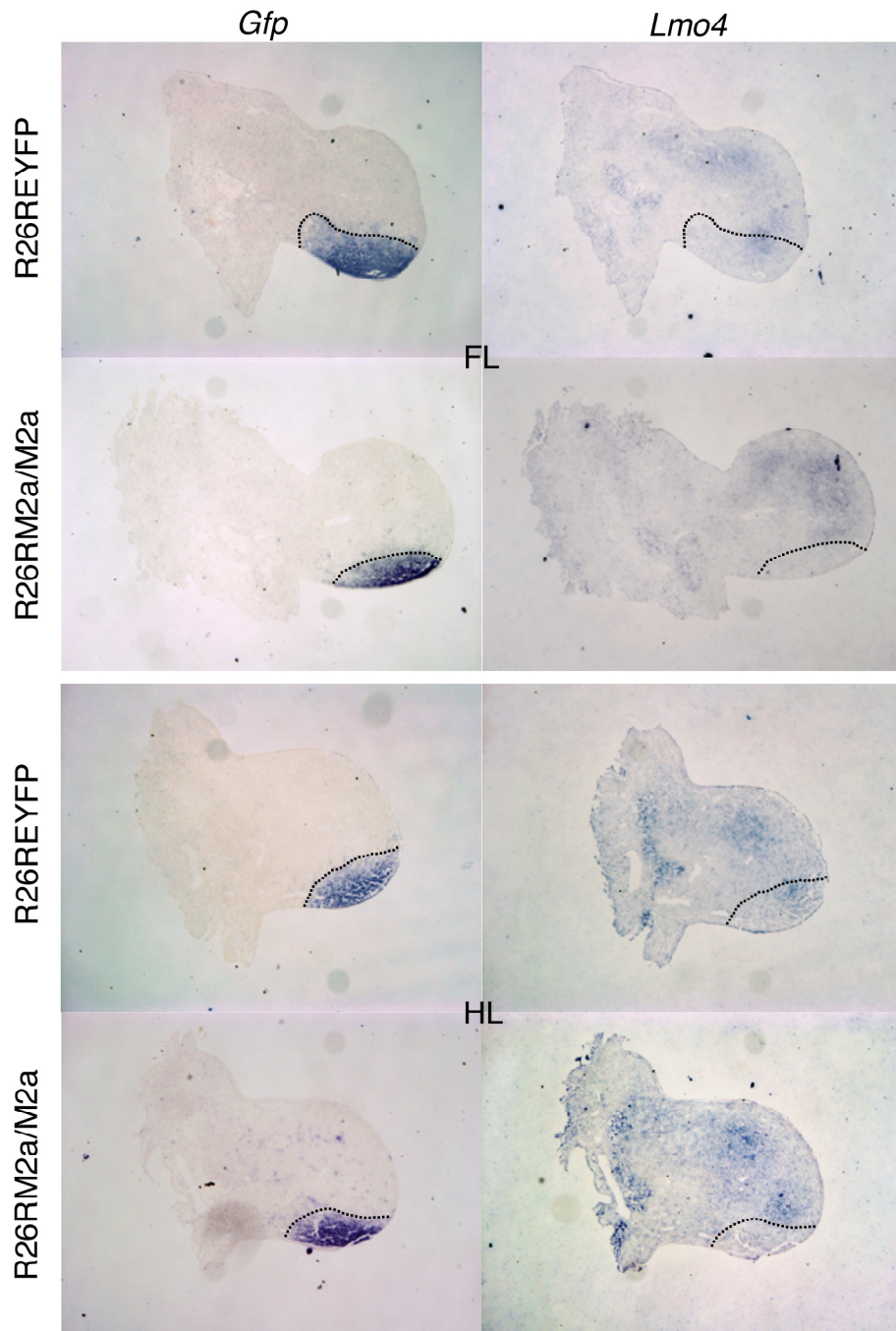




**Figura R37 (página anterior).** La sobreexpresión de *Meis2* correlaciona parcialmente con dominios ectópicos de expresión de ITGA9. **a – d'**, Inmunodetección de EYFP (**a, c, d, e**) e ITGA9 (**a', c', d', e'**) en secciones confocales de extremidades control (**a – b'**) y que sobreexpresaban *Meis2* en doble copia (**c – d'**), de estadio E11.5. En **a, a', c y c'**, la línea punteada delimita el perfil del primordio de extremidad (extremo proximal en la parte inferior y polo anterior en la parte izquierda). Los canales de una misma sección se muestran por separado para evitar que la tinción verde enmascare visualmente a la roja. La punta de flecha en **c'** señala el dominio ectópico de expresión de ITGA9 (nótese que no se extiende por toda la región positiva para EYFP). Esa misma región aparece ampliada y rotada en **b y b'** para el control y **d y d'** para el experimental (la línea punteada en estos paneles delimita la región positiva para EYFP en la que las células están más compactadas). Nótese que la tinción ITGA9 se restringe, como era de esperar, a la membrana, y que en el caso control no guarda ninguna relación con el linaje de *Shh*. Sin embargo, en el caso experimental, los límites de la expresión de ITGA9 tienden a quedar confinados dentro de la región de sobreexpresión de *Meis2*. Se analizaron más de 30 secciones de un total de 4 extremidades control (2 superiores y 2 inferiores) y otras 30 de 4 extremidades experimentales (2 superiores y 2 inferiores). Se hace notar que las extremidades experimentales utilizadas eran algo más avanzadas (E12) que las control (E11.5).

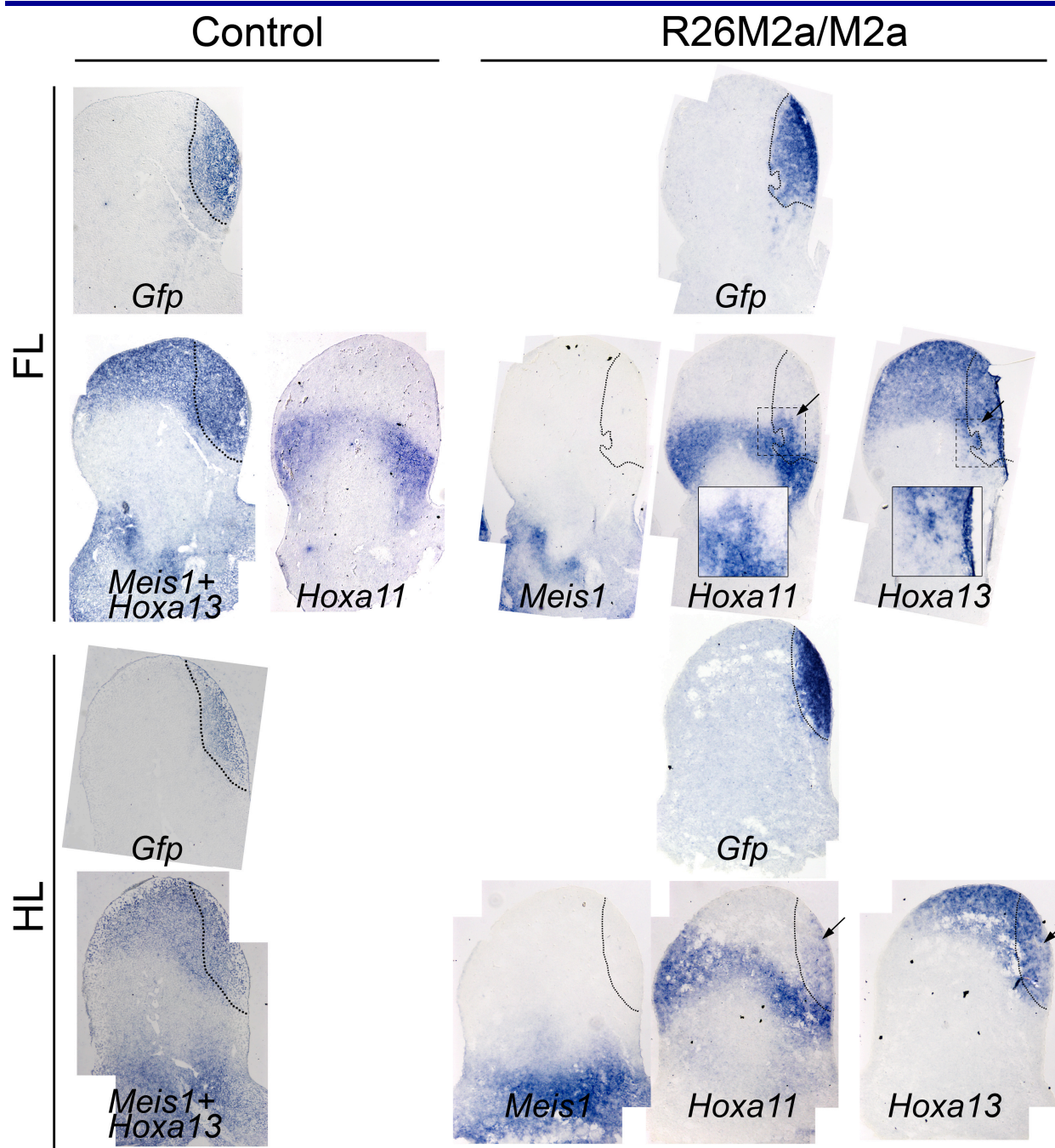
También se estudiaron los modificadores de cromatina. La expresión de *Lmo4* se analizó por hibridación *in situ* en secciones de parafina de extremidades de E11.5. Se confirmó que la expresión de *Lmo4* está muy disminuida en el linaje de *Shh* cuando se sobreexpresa *Meis2*. En realidad, más que una pérdida de esa región del dominio de expresión de *Lmo4*, lo que parece ocurrir es un desplazamiento o compresión de la zona posterior de dicho dominio hacia la región anterior, lo que podría sugerir que la sobreexpresión de *Meis2* está provocando también efectos no autónomos (Fig. R38). En cuanto a *Brd8*, todavía no se ha conseguido una sonda que funciones satisfactoriamente.

Finalmente, y aunque su expresión no aparecía modificada en el *microarray*, se comprobó si los niveles o los dominios de expresión de *Meis1*, *Hoxa11* y *Hoxa13* estaban afectados por la sobreexpresión de *Meis2*. Aunque de momento sólo se han analizado en detalle cuatro especímenes y la magnitud del efecto variaba entre éstos, sí que parecía observarse cierta reducción de la expresión de *Hoxa13* en parte del linaje *Shh*, así como una expresión ectópica de *Hoxa11* en dicha región (Fig. R39). Estos resultados eran en cierto modo esperables, ya que este tipo de efectos ya habían sido descritos para la sobreexpresión de *Meis1* tanto en pollo como en ratón, aunque en esos casos la región más afectada era la parte anterior de la extremidad, mientras que la posterior era más resistente (Mercader *et al.*, 1999; Mercader *et al.*, 2009). Por otro lado, no se observó expresión ectópica de *Meis1* (Fig. R39), lo que sugería que la proximalización molecular, además de sutil y regionalmente restringida, era incompleta. Estos cambios en el código *Hox* podrían estar contribuyendo a los cambios en las propiedades de adhesión observados al sobreexpresar *Meis2*.



**Figura R38.** El dominio de expresión de *Lmo4* se ve afectado por la expresión ectópica de *Meis2*. Se muestran secciones adyacentes de 7 micras hibridadas con sonda de *Gfp*, que marca las células descendientes de las que alguna vez expresaron *Shh* (delimitado por la línea punteada), y sonda de *Lmo4*, según se indica. A la izquierda se indica si la extremidad es control (R26REYFP) o experimental (R26RM2a/M2a). Se analizaron tanto extremidades superiores (FL) como inferiores (HL). Nótese que la expresión de *Lmo4* invade el linaje de *Shh* en la extremidad control, mientras que en la experimental no lo hace. Esto sugiere que su expresión es controlada de manera negativa por *Meis2*.





**Figura R39.** La sobreexpresión de *Meis2* en el linaje *Shh* provoca una disminución de la expresión de *Hoxa13* y la expresión ectópica de *Hoxa11*. Se muestran resultados de hibridación *in situ* sobre secciones adyacentes de extremidades control y experimentales, según se indica en la parte superior. La expresión de *Gfp* marca el linaje *Shh* (delimitado por la línea punteada). FL= extremidad superior, HL= extremidad inferior. Los resultados son preliminares porque sólo se han analizado 4 especímenes experimentales (en secciones, ya que en la extremidad entera el efecto es difícil de apreciar). Nótese que la expresión de *Hoxa13* está reducida en algunas de las células que sobreexpresan *Meis2* ( $n=3/4$ ), y que es en esas zonas (flechas) donde se aprecia expresión ectópica de *Hoxa11* (comparar los detalles a mayor aumento de las regiones recuadradas). La variabilidad en la penetrancia y/o expresividad del fenotipo podría explicar por qué no se vio alterada su expresión en el *microarray*. En cualquier caso, el cambio de identidad molecular no parece ser completo, ya que *Meis1* no se activa en la región de sobreexpresión de *Meis2*, al menos en las 4 extremidades analizadas.



## **V. DISCUSIÓN**



En esta tesis doctoral se ha abordado el problema de cómo se produce la formación de patrón de una estructura que está en constante crecimiento. Éste es un problema muy común en biología del desarrollo, y un modelo paradigmático para su estudio es el desarrollo P-D de la extremidad. Hay varios aspectos especialmente interesantes a analizar en un escenario de este tipo: la contribución de diversas estirpes celulares a la estructura final y la evolución de dicha contribución en el tiempo; la importancia relativa de mecanismos autónomos o no autónomos celulares; y la relación entre la regulación de las propiedades celulares y el patrón en el que se organizan esas células. Así pues, se ha estudiado la dinámica de la contribución de los linajes celulares de *Meis1* y *Hoxa13* (IV.1 y IV.2), dando lugar a la primera colección de mapas de destino basada en marcadores P-D. También se ha evaluado la capacidad de las células de la extremidad para responder a señales difusibles endógenas, así como el requerimiento temporal de dichas señales, lo que ha conducido a la proposición de un nuevo modelo de formación de patrón que integra y combina aspectos de modelos preexistentes de un modo que puede explicar resultados aparentemente contradictorios de la literatura (IV.3). Finalmente, se ha estudiado la función de *Meis2* en la extremidad mediante su sobreexpresión, tanto aleatoriamente como espacialmente restringida. Concretamente se ha analizado su efecto sobre diversos parámetros celulares, incluidos viabilidad y propiedades de adhesión, y se ha llevado a cabo un análisis transcriptómico comparativo para intentar encontrar las dianas de este gen en la extremidad (IV.4).

A continuación se argumenta cómo los resultados obtenidos han permitido avanzar en algunas de las cuestiones pendientes del campo (en *negrita cursiva* en la Introducción). Además, en el Material Suplementario se discuten individualmente algunos experimentos que requieren mayor explicación. Debe aclararse que los proyectos IV.1 y IV.2 no están tan avanzados como el IV.3 y IV.4, por lo que se ha recurrido a la especulación cuando se requerían más datos de los disponibles.

## V.1 Relación entre la expresión génica y el destino P-D.

Aunque por motivos técnicos no se ha podido estudiar la contribución del linaje de *Hoxa11* a la extremidad (ver Material Suplementario), el análisis de los linajes de *Meis1* y *Hoxa13* en distintos estadios ha permitido alcanzar algunas conclusiones interesantes. Así, se ha establecido el mapa de destino de las células que expresan dos de los llamados marcadores P-D en distintos momentos del desarrollo de la extremidad.

### V.1.1 Linaje de *Hoxa13*.

Antes de comentar los resultados del trazado de linaje de *Hoxa13*, es importante considerar una pequeña limitación del abordaje. La inserción del gen *CreER*<sup>T2</sup> en el *locus* de *Hoxa13* conlleva la pérdida de función del alelo modificado, y el mutante heterocigoto de falta de función de *Hoxa13* tiene un fenotipo ligeramente anormal en la extremidad (Fromental-Ramain *et al.*, 1996b). Concretamente, el dedo 1 está malformado y se produce una sindactilia de tejido blando entre los dedos 2 y 3. *A priori* no es esperable que esos defectos puedan alterar mucho el resultado del trazado de linaje, pero sin duda es algo que debe tenerse en cuenta.

Aunque ya se sospechaba (Lu *et al.*, 2008), **los resultados confirman que *Hoxa13*, independientemente de su función, sólo es marcador de autopodio**, al menos en los estadios estudiados. Es destacable que, en E14.5, se ha descrito expresión de GFP en las células que rodean la parte distal de la tibia de ratones *Hoxa13*<sup>GFP/+</sup> (Perez *et al.*, 2010). Esta



aparente discrepancia con nuestros resultados podría explicarse de dos maneras: 1) La expresión que rodea la parte distal de la tibia sólo tiene lugar a partir de E12, y por eso no se detectó en nuestro estudio. 2) Los niveles de expresión en esa región son tan bajos o tan espacialmente restringidos que el nivel de marcaje quedó por debajo de la sensibilidad de nuestro análisis. Es útil mencionar que el grupo de Marie Kmita también ha trazado el linaje de *Hoxa13*, pero mediante una Cre constitutiva, y no ha informado de la presencia de marca rodeando la tibia (comunicación personal). De confirmarse mediante análisis histológico, ese resultado descartaría ambas posibilidades mencionadas. Una tercera, por tanto, es que la señal que detectaron Pérez y colaboradores no fuera real, sino autofluorescencia.

Lo que sí resultó más sorprendente fue el hecho de que **el marcaje más temprano del linaje *Hoxa13* se extendía casi por todo el autopodio**, exceptuando el dedo 1 y los carpos/tarsos. La primera expresión de este gen que se puede detectar por hibridación *in situ* comienza en una región de pequeño tamaño, en una posición postero-distal (visible en la extremidad superior a aproximadamente E10.25, unos 33-34 somitos (Mercader *et al.*, 2009)). En los siguientes estadios, la expresión de *Hoxa13* se extiende no sólo por linaje, sino por activación *de novo* en células que antes no lo expresaban (Nelson *et al.*, 1996). Con ese marcaje temprano (inyección de 4HT a E9.5) no todas las extremidades analizadas tenían clones, y en las que tenían, éstos no representaban más que una pequeña fracción. Eso probablemente significaba que las últimas trazas de 4HT (que a las 20-24 horas ya se ha eliminado del organismo) estaban llegando en los primeros momentos de expresión de *Hoxa13*. Teniendo esto en cuenta, resulta sorprendente que los descendientes de una población tan reducida puedan distribuirse por casi todo el autopodio. La explicación más parsimoniosa sería que las células del futuro autopodio se pueden mezclar mucho entre sí, de modo que las primeras células en activar *Hoxa13* serían las primeras en contribuir a los dedos 2 a 5, pero no las únicas. Sin embargo, se ha descrito que ese grado de mezcla no existe en la extremidad, ya que incluso clones inducidos muy temprano (con mucho tiempo para proliferar, por tanto) no se expanden más allá del territorio de uno o dos dedos (Arques *et al.*, 2007). La alternativa es que las células que activan *Hoxa13 de novo*, tras la activación inicial, sólo contribuyen a los nuevos destinos (dedo 1 y carpos/tarsos). Esto implicaría que las células que primero activan *Hoxa13* tienen que expandirse más que el resto, para ser capaces de generar los dedos 2 a 5 sin contribución de otros linajes. Aunque la tasa de proliferación no es más alta en esa región posterodistal que en las regiones vecinas (Fernandez-Teran *et al.*, 2006; Boehm *et al.*, 2010), sí que es cierto que las primeras células que activan *Hoxa13* proliferan, a partir de ese momento, durante más tiempo que las que activan *Hoxa13* más tarde. Concretamente, hemos mostrado que transcurre alrededor de medio día desde que se marcan los precursores de los cuatro dedos más posteriores hasta que se pueden marcar los precursores del dedo 1. En ese tiempo el número de células puede duplicarse o casi triplicarse, lo que sin duda contribuye a la mencionada expansión diferencial de ese linaje temprano.

Otro aspecto interesante es que la expansión del linaje *Hoxa13* parece ser escalonada en vez de progresiva, sobre todo en lo que respecta a la distinción mesopodio/acropodio (muñeca/resto de autopodio) en la extremidad superior. Así, el límite proximal del linaje *Hoxa13* permanece sin invadir la zona de los carpos desde E10 hasta E11.5 (inyecciones a E9.5 y E11, respectivamente), en lugar de expandirse progresivamente. Este resultado, en el contexto de la Fase 2 del modelo propuesto en esta tesis (ver apartado V.5.1), sugiere que algunas regiones precursoras requieren más tiempo que otras para la activación de *Hoxa13*, de modo que esta activación ocurre de forma modular. Esto podría ser interesante para el refinamiento del modelo. En cuanto a la frecuencia de marcaje en cada dedo/interdígito (Fig. R4), los resultados deben considerarse preliminares porque sólo se han analizado 6 extremidades de dos camadas distintas. Llama la atención el hecho de que el marcaje tiende a acumularse en los primordios de los cuatro dedos más posteriores con más frecuencia que en los interdígitos, en un estadio en el que la eliminación del interdígito no ha avanzado mucho todavía, por lo que difícilmente puede

influir en el resultado. La excepción parece ser el dedo 4, pero esto se debe muy probablemente al bajo muestreo, ya que si se incluyen los datos de otras 6 extremidades algo más avanzadas (provenientes de una camada que no estaba exactamente al estadio esperado), el dedo 4 tiene una frecuencia de marcaje muy similar a la de sus vecinos (Fig. S3). En cualquier caso, estos datos podrían permitir especular que **los precursores de los dedos están más representados que los del interdígito en los primeros momentos de expresión de *Hoxa13***, un escenario que se explorará con más detalle próximamente.

El retraso en la aparición de marcaje en el dedo 1 es probablemente un resultado real, pero no se puede descartar que sea debido a los defectos en el desarrollo de dicho dedo en los individuos heterocigotos. Un modo de comprobarlo sería marcar con Dil la región más temprana de expresión de *Hoxa13* en un embrión de ratón silvestre, y cultivarlo *ex vivo* para comprobar si el marcaje se extiende hasta el dedo 1 o no.

### V.1.2 Linaje de *Meis1*.

Ni el heterocigoto ni el homocigoto de falta de función de *Meis1* presentan un fenotipo anómalo en la extremidad (Hisa *et al.*, 2004; Azcoitia *et al.*, 2005), por lo que la línea *Meis1*<sup>CreERT2/+</sup> no tenía el inconveniente mencionado para la línea *Hoxa13*<sup>CreERT2/+</sup>. En concordancia con su patrón de expresión, el linaje de *Meis1* marcado en momentos tempranos se extiende por todo el eje P-D, mientras que el marcado en estadios más avanzados se restringe al estilopodio (Fig. R3). Lo sorprendente fue que, al marcarlo en un determinado momento del desarrollo, dicho linaje no cubriera toda la longitud del estilopodio, sino sólo aproximadamente la mitad proximal. En el embrión de pollo se ha descrito que la expresión de *Meis1* ocupa todo el estilopodio, hasta el codo, en estadios en que los elementos esqueléticos ya son detectables (Mercader *et al.*, 1999), y en esta tesis se ha descrito que el propio húmero de pollo expresa *Meis1* incluso en la región distal (Fig. R17), y que el húmero de ratón adulto expresa *Meis1* a lo largo de toda su longitud (Fig. R5). Por tanto, la ausencia de marcaje en la mitad/tercio distal del estilopodio de ratón durante el desarrollo podía tener dos explicaciones fundamentalmente: una diferencia interespecífica pollo – ratón, o bien la expresión de *Meis1* en ambas especies se pierde en algún momento en la región distal del estilopodio y luego vuelve a recuperarse. Es destacable que el grupo de Marie Kmita, analizando detenidamente el límite de expresión de *Meis1* y la posición del codo en embriones de ratón, ha llegado a la conclusión de que la expresión de *Meis1* no ocupa todo el estilopodio (comunicación personal). Sería interesante comprobar si el linaje de *Meis2* en este estadio también marca la misma región, o por el contrario se extiende hasta el codo. Por supuesto, averiguar si el límite proximal del linaje de *Hoxa11* en estadios equivalentes llega hasta el codo o hasta el límite del linaje *Meis1* también resultaría sumamente útil.

Otro resultado sorprendente es que *Meis1* parece expresarse en la región proximal del zeugopodio de ratones adultos. Esto debe todavía comprobarse a nivel histológico, pero de confirmarse podría implicar que en esa región se produce una transición en algunas propiedades celulares entre el embrión y el estado adulto.

### V.2 Papel de señales endógenas en el desarrollo P-D de la extremidad.

#### V.2.1 Papel de RA endógeno.

Como ya se ha comentado en la Introducción, si bien el papel distalizante de los FGFs endógenos está bastante aceptado entre la comunidad científica (Mercader *et al.*, 2000; Mariani *et al.*, 2008), existe un debate acerca de si RA endógeno es necesario o no para la formación de patrón en la extremidad (Yashiro *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2009; Pennimpede *et al.*, 2010). En el presente trabajo se ha demostrado que las señales proximales endógenas existen, pero que su efecto instructivo sólo afecta a células de la extremidad cuando el equilibrio entre señales proximales/distales está desplazado hacia las primeras (bien usando inhibidores de señalización FGF, aplicando RA exógenamente en grandes cantidades, o preparando extremidades recombinantes). Además, se ha comprobado que RA es un componente muy importante de dichas señales proximales endógenas, y que es necesario y suficiente para la expresión de *Meis1* y la formación del estilopodio en extremidades recombinantes (RLs). Debe recordarse que las células que componen estas RLs están destinadas a formar zeugopodio y autopodio, pero no estilopodio, y aún más importante, dichas células expresan *Hoxa11* pero no *Meis1* antes de ser transplantadas. Por tanto, podría decirse que al transplantarlas a somitos (sRLs), **se está produciendo una reprogramación de destino y de identidad molecular**. De hecho, los sRLs recién transplantados probablemente representan el estado más primigenio de las células de la extremidad, en el que sólo hay señalización de RA y no de FGF (comparar Fig. D2 con R18A).

Anteriormente ya se había mostrado que la señalización de RA es necesaria para la correcta formación de estructuras proximales (Mercader *et al.*, 2000) o para la inducción de la extremidad (Stratford *et al.*, 1996; Mercader *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2009). En este trabajo además se ha demostrado que **RA es necesario y suficiente para la especificación del estilopodio**. Esto, obviamente, contrasta mucho con los resultados del grupo de Gregg Duester, que sugieren que RA no es necesario para la formación de patrón en la extremidad, sino sólo para su inducción (Zhao *et al.*, 2009). Sin embargo, los únicos datos que realmente respaldan esa teoría son los obtenidos con la línea testigo de señalización de RA, con la que comprueban que a pesar de no haber señal en el primordio de extremidad, ésta adquiere un patrón P-D y A-P **relativamente** normal. Hay estudios en los que se ha mostrado que esa línea testigo no siempre identifica adecuadamente los lugares de producción de RA (Luo *et al.*, 2004), por lo que es importante comprobar qué ocurre con las dianas endógenas. Así, ya se ha mencionado que *Meis2* y *Cdx1*, ausentes en el mutante no rescatado, se expresan (aunque *Cdx1* muy débilmente) cuando se rescata brevemente con RA. Hay al menos tres posibles explicaciones para esto: 1) Por alguna razón, la línea testigo no funciona adecuadamente cuando los niveles de RA son muy limitantes, quizá porque proteínas del tipo CRABP-II secuestran todo el RA disponible para dirigirlo hacia los receptores que se unen a RAREs endógenos, en vez de al triple RARE artificial que utiliza la línea testigo (Rossant *et al.*, 1991). 2) La línea testigo funciona bien pero lo que ocurre es que *Meis2* y otras dianas endógenas requieren RA para su iniciación pero no para su mantenimiento, y por eso se expresan aunque el testigo no detecte señalización de RA. Esta última posibilidad parece no obstante poco probable, porque microesferas cargadas con un antagonista de RA son capaces de inhibir la expresión de *Meis1/2* cuando se aplican bastante tiempo después de la inducción de la extremidad, al menos en el embrión de pollo (Mercader *et al.*, 2000). 3) Aunque poco probable, es posible que en este aspecto haya diferencias entre pollo y ratón.

Sin embargo, una crítica importante que se puede hacer al presente trabajo es que las conclusiones acerca de RA endógeno se han obtenido usando un modelo que requiere mucha manipulación, como son los RLs. No obstante, ya se ha demostrado que los RLs se comportan en muchos aspectos como extremidades normales, con una progresión en la expresión de marcadores moleculares y en la formación de condensaciones (este trabajo y (Ros *et al.*, 1994; Fernandez-Teran *et al.*, 1999; Elisa Piedra *et al.*, 2000)). Además, constituyen el único método para sacar a las células distales de su entorno de alta señalización de FGF sin necesidad de usar inhibidores químicos que comprometan el crecimiento subsiguiente. Otros posibles problemas (expresión génica a las 8 horas de injertarlas, efecto de la tripsinización) se tratan en el Material Suplementario.

### V.2.2 Efectos y requerimiento temporal de los FGFs. Implicaciones para el modelo.

En esta memoria se ha mostrado que las señales del AER, muy probablemente los FGFs (ver apartado I.2.5.5), son capaces de reclutar hacia destinos más distales aquellas células que quedan a una cierta distancia, menor de 200 y posiblemente mayor de 100 micras. De hecho, experimentos adicionales con injertos de entre 120 y 180 micras (no mostrado) revelaron que la distancia máxima a la que se produce este reclutamiento es de unas 170 micras, cifra bastante similar a las 162 micras descritas como rango de influencia del AER en transplantes de fragmentos de mesénquima a regiones subapicales (Krabbenhoft y Fallon, 1989). Es interesante que parece que sólo las células precondrogénicas pueden ser reclutadas por estas señales, ya que si el injerto prendía muy superficialmente, no se observaba ese reclutamiento.

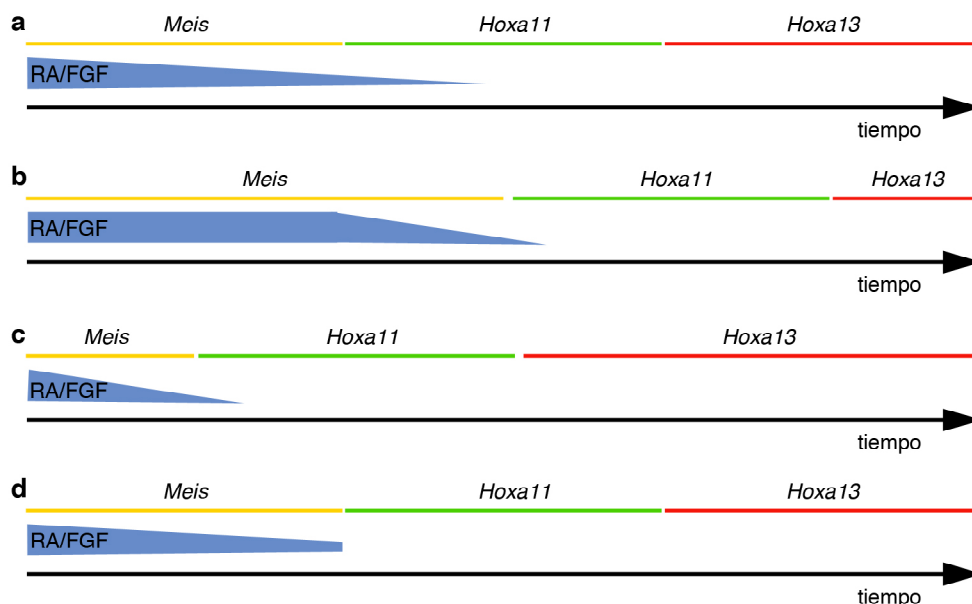
En definitiva, **en el contexto experimental de transplantes de punta distal, las señales proximales se ven superadas por las distales**. Además, el reclutamiento por señales distales podría explicar una buena parte de los resultados de la literatura en los que no se determinó el origen del tejido generado por la regulación (Zwilling, 1956; Kieny, 1964a,1964c; Summerbell, 1977a,1981). Seguiría sin poder explicarse, no obstante, el resultado descrito por Kieny y colaboradores en el que el elemento intermedio provenía tanto del receptor como del donante (Pautou y Kieny, 1977). Recuérdese que en sus transplantes de autopodio de pollo sobre estilopodio de codorniz, el zeugopodio formado estaba compuesto por tejido de pollo en la parte postaxial y de codorniz en la preaxial. Una posible explicación sería que el mapa de destinos que se usó para inferir qué futuros elementos se estaban transplantando no fue bien interpretado o no era del todo exacto, de modo que junto con el autopodio de pollo se estaba transplantando la parte postaxial del zeugopodio, y a su vez la parte preaxial del zeugopodio fue formada por tejido de codorniz reclutado por el AER del injerto. No obstante, eso no explicaría por qué en la combinación inversa (codorniz sobre pollo) no se da regulación, aunque se puede especular que quizá el AER de codorniz no produce niveles suficientemente altos de FGF como para reclutar tejido de pollo.

A pesar de que este efecto distalizante de FGF ha sido mostrado por varios trabajos, lo que no se conoce es si ese papel instructivo es necesario durante todo el período de formación de patrón o no. Una consideración teórica importante es que dado que la señalización FGF está presente durante la mayor parte de la especificación P-D, su papel cualitativo distalizante sólo se puede dar en el inicio. Después, sólo podría seguir teniendo un papel instructivo (especificación de destinos cada vez más distales), si los niveles de señalización cambiaran, o si la señal fuera integrada con el tiempo. Argumentos similares pueden emplearse con otras señales producidas por el AER. Puesto que el intercambio de AER y mesénquima de distintos estadios no afecta al patrón P-D (Rubin y Saunders, 1972), la opción de cambio en los niveles de señalización parece poder descartarse. La segunda opción (integración de la señal) es uno de los aspectos que se han estudiado en esta tesis. El análisis temporal de la expresión de marcadores P-D en RLs y en

## V. DISCUSIÓN

extremidades normales reveló que si bien la duración de la transición *Meis1/Hoxa11* se podía alterar mediante la manipulación de la señalización de RA y FGF, la transición *Hoxa11/Hoxa13* no se podía acelerar con ninguna de las señales aplicadas (FGF, SHH o antagonistas de RA). Lo único que se podía conseguir era expandir el dominio endógeno, una vez que ésta ya existía. Esto sugería que esta última transición no respondía a señales, sino que era un proceso autónomo, y que la única manera de afectar al momento en que *Hoxa13* se activa sería alterando el momento en que la transición *Meis1/Hoxa11* tiene lugar (Fig. D1b, c). La hipótesis de la autonomía de la segunda fase se comprobó mediante transplantes a somitos de puntas distales de primordios de HH19-20, que ya expresan *Hoxa11*. Si se trataban con el inhibidor de señalización FGF, la señalización de RA instruía al mesénquima distal para “apagar” *Hoxa11* y expresar *Meis1*, lo que tenía como consecuencia que *Hoxa13* no se expresase cuando le correspondía. Si además de tratar con el inhibidor de FGFR1 se trataban con el antagonista de RA, los transplantes quedaban esencialmente libres de señalización P-D, y sin embargo la evolución de su perfil transcripcional no se detenía, sino que llegaba a expresar *Hoxa13* (Fig. R21 y D1d). De este resultado se puede deducir que una vez que la transición *Meis1/Hoxa11* ha tenido lugar, el efecto instructivo de FGF ya no es estrictamente necesario para la formación de patrón. En realidad es muy probable que siga siendo necesario para bloquear la señalización de RA hasta que la región indiferenciada de la extremidad se aleje de la fuente de RA, y por supuesto seguirá siendo necesario para mantener adecuadamente el estado indiferenciado de las células distales; pero su efecto instructivo *per se*, que se manifiesta claramente en su capacidad de extender *Hoxa11* en los RLs injertados en somitos (algo que no puede hacer el antagonista de RA, Fig. R18), ya no es necesario.

En definitiva, **se pueden distinguir dos fases en la formación de patrón P-D**. Una fase no autónoma, dependiente de señales difusibles, y otra, parecida al modelo de la zona de progreso, principalmente gobernada por mecanismos autónomos, en la que el tiempo de desarrollo (quizá un reloj molecular) es lo que establece el estado de especificación.





**Figura D1 (página anterior).** La transición *Meis1/Hoxa11* se puede afectar por señales, no así la *Hoxa11/Hoxa13*. **a**, Situación normal. *Meis1* deja de expresarse cuando la relación RA/FGF baja lo suficiente, momento a partir del cual puede expresarse *Hoxa11*. **b**, Situación en la que el equilibrio RA/FGF se ve desplazado hacia RA (aplicación de una microesfera con RA, RL injertado en somitos, o inhibidor de FGF aplicado a un trasplante en somitos). La transición *Meis1/Hoxa11* se retrasa, y como consecuencia la activación de *Hoxa13* ocurre más tarde. Nótese que según el modelo, el tiempo de expresión de *Hoxa11* es constante, ya que la transición hacia *Hoxa13* no depende de señales. **c**, Situación hipotética en la que el equilibrio se desplaza hacia el lado de FGF, de modo que *Meis1* deja de expresarse antes de tiempo, la transición hacia *Hoxa11* ocurre precozmente, y como consecuencia, *Hoxa13* también se activaría antes. Nótese que esta activación precoz de *Hoxa13* no se debe a que se acorte el período de expresión de *Hoxa11*, sino a que la fase no autónoma dura menos de lo normal. **d**, Situación en la que a partir de HH19-20, se elimina la señalización RA y FGF. La formación de patrón transcurre normalmente sin necesidad de señales P-D.

En este nuevo modelo híbrido, las señales P-D no afectarían al ritmo del supuesto reloj molecular de la fase autónoma. Es destacable que un trabajo reciente ha llegado a una conclusión diferente. Mediante la eliminación de FGFR2 en las células del AER, Lu y colaboradores provocaron la ablación genética de esta estructura. No observaron un aumento de la apoptosis ni una disminución de proliferación, y sin embargo la extremidad se truncaba, faltando el autopodio (Lu *et al.*, 2008). La explicación propuesta se basaba en la observación de que la expresión de *Hoxa13* en el mutante se retrasaba unas tres horas (tiempo de generación de dos somitos) respecto a la condición silvestre. Según su modelo, el retraso se debería a que el AER actúa como un “temporizador” que controla la generación de precursores de autopodio, de modo que cuando se pierde el AER, ese proceso se ralentiza. Según los autores del trabajo, ese retraso provoca que los precursores de autopodio no alcancen un número adecuado antes de que comience la diferenciación, por lo que fracasa la formación de esa estructura. Al menos dos cosas deben tenerse en cuenta acerca del mencionado trabajo. Primero, otro grupo ha estudiado exactamente el mismo mutante (Yu y Ornitz, 2008) y sí que ha informado de diferencias en apoptosis y proliferación (aunque no existe consenso acerca de la validez de esos datos). Segundo, un efecto comprobado de la pérdida de las señales del AER es que el mesénquima subapical no puede mantenerse indiferenciado, de modo que el proceso de diferenciación se adelanta. Así pues, incluso dejando de lado la posibilidad de que la muerte y proliferación del mesénquima subapical estén afectadas (fenómenos que por sí solos podrían explicar el fenotipo, como ocurre en el embrión de pollo (Dudley *et al.*, 2002)), el proceso precoz de diferenciación también podría explicarlo. Si la diferenciación tiene lugar antes de lo normal, es obvio que ocurrirá cuando el número de precursores de autopodio está menos expandido de lo habitual, independientemente de si estos precursores se empezaron a generar con retraso o no. Respecto a si el retraso que los autores observan en el comienzo de expresión de *Hoxa13* es significativo, no parece muy probable. Dos somitos es una diferencia muy pequeña como para tener un efecto a largo plazo, sobre todo teniendo en cuenta que la expresión normal se detecta siempre en un rango que incluye dos posibles edades en cuanto al número de somitos (31-32 según Lu y colaboradores, 33-34 según los datos de nuestro laboratorio (Mercader *et al.*, 2009)).

Una característica interesante de este modelo de especificación es que durante cierto tiempo se puede revertir, aunque a partir de cierto punto se vuelve refractario a esa reversión. Así, el efecto conseguido con el tratamiento de RA exógeno en los trasplantes de punta distal disminuía conforme aumentaba la edad del donante (Fig. R8). Una disminución similar se había descrito para el potencial P-D de extremidades recombinantes hechas a partir de células de donantes progresivamente más avanzados (Dudley *et al.*, 2002). Curiosamente, la relación entre el elemento más proximal formado y el estadio del donante (estilopodio completo con HH20, zeugopodio con HH22 y autopodio con HH24) es idéntica en ambos trabajos, sugiriendo que ese potencial límite es una propiedad intrínseca de las células utilizadas. Puesto que estas células

pertenecían siempre a la región indiferenciada, la única diferencia entre ellas debía ser su perfil de expresión génica (o en otras palabras, su tiempo de permanencia en la zona indiferenciada). Concretamente, una de las diferencias posiblemente más importantes sería la expresión de *Hoxa11* y *Hoxa13*. En HH19-20, el fragmento de primordio de pata utilizado expresaría mayoritariamente *Hoxa11* y un poco de *Hoxa13*; en HH 21-22, todo el fragmento coexpresaría *Hoxa11* y *Hoxa13*, mientras que en HH24, todo el fragmento expresaría *Hoxa13* pero no *Hoxa11* (Nelson *et al.*, 1996). Un trabajo reciente ha mostrado que la apertura progresiva de la cromatina del *cluster* HoxD es un parámetro importante para su colinearidad temporal de expresión en el eje principal del cuerpo (Soshnikova y Duboule, 2009), y es muy probable que el *cluster* HoxA funcione de la misma manera, también en la extremidad. Dado el efecto que RA y *Meis1/2* tienen sobre la expresión *Hox* en la extremidad (este trabajo y (Mercader *et al.*, 2000; Mercader *et al.*, 2009)), se puede hipotetizar que el desplazamiento de la zona activa de la cromatina puede ser revertido al aplicar RA, pero sólo hasta cierto punto o sólo durante el período en que la expresión de *Hoxa13* (el último del *cluster*) no está consolidada.

En esta tesis no se han probado otras señales más allá de RA, SHH y FGF para demostrar que la segunda fase es autónoma, por lo que queda la duda de si señales como Wnts o BMPs podrían tener un papel instructivo durante esta fase, lo que la convertiría en no autónoma. Sin embargo, hay varios datos que están en contra de esta posibilidad. Así, cuando el AER es eliminado, microesferas cargadas con FGF son suficientes para mantener el desarrollo y crecimiento de la extremidad, incluyendo la expresión de *Hoxa11* y *Hoxa13* (Niswander *et al.*, 1993; Vargesson *et al.*, 2001), lo que sugiere que otras señales no pueden ser necesarias para esos eventos. Además, Wnts y BMPs se expresan en el AER desde mucho antes que *Hoxa13* en el mesénquima, por lo que, de tener un efecto en su expresión, tendría que ser a través de la **integración temporal** de la señal. La integración de una señal implica un mecanismo celular capaz de medir la señal acumulada en el tiempo, y por tanto, parcialmente autónomo. Por último, hay ejemplos en los que la combinación de BMPs y FGFs pueden activar genes distales en la región proximal, pero esto siempre ocurre una vez que el dominio endógeno ya se ha activado, no antes (Capdevila *et al.*, 1999), sugiriendo de nuevo que tiene que pasar un tiempo para activar esos genes distales.

En este trabajo se han mostrado experimentos en los que la duración de la Fase 1 era prolongada mediante la manipulación de señales (RLs injertados en somitos, o trasplantes distales tratados con RA o inhibidor de FGF), retrasando en consecuencia la activación de *Hoxa13*, pero no se han mostrado casos en los que Fase 1 haya sido acortada, adelantando la expresión de *Hoxa13* (situación hipotética en Fig. D1c). El principal problema es técnico, y tiene que ver con lo relativamente temprano que termina la Fase 1. Para provocar una activación precoz de *Hoxa11* lo más directo sería aplicar microesferas cargadas con FGF en el pre-primordio de extremidad, antes de que empiece la expresión endógena de *Fgf8*. No obstante, el territorio es tan pequeño en esos estadios (HH16) que los intentos que se hicieron de insertar microesferas bajo el ectodermo terminaron con el primordio irremediablemente dañado, y no se pudo comprobar el efecto sobre la expresión génica. Una manera de solucionarlo sería usar sRLs, ya que recién formados su estado molecular es probablemente muy parecido al de un pre-primordio de extremidad antes de expresar *Fgf8*, y a la vez su tamaño es mucho más apto para la manipulación experimental. De hecho, ya se ha mostrado que la aplicación de microesferas cargadas con FGF4 en estos sRLs provoca una expansión temprana de *Hoxa11*, sugiriendo que sí está consiguiendo acortar la Fase 1 (Fig. R18). Sin embargo esto no da lugar a la activación precoz de *Hoxa13*, y de hecho afecta negativamente a su expresión. En trabajos previos de la literatura ya se había descrito que la aplicación de FGF4 en primordios de extremidad, lejos de expandir la expresión de *Hoxa13*, la inhibe (Vargesson *et al.*, 2001). Esto se interpretó como que

sólo niveles fisiológicos de FGF eran compatibles con la expresión de *Hoxa13*, además de que el tiempo parecía ser otra variable relevante.

### V.3 Papel de los genes *Meis/Hox* en el desarrollo P-D de la extremidad.

A lo largo de los últimos 20 años se ha estudiado la función de los genes *Hox* y más tarde *Meis* en la formación del eje principal del cuerpo en general y de la extremidad en particular. A pesar de que se han mutado, sobreexpresado, intercambiado o incluso invertido dentro de su región cromosómica, las funciones celulares controladas por estos factores son todavía poco conocidas. En esta tesis se ha intentado aportar algo a este esquivo conocimiento, especialmente en lo que se refiere al desarrollo de la extremidad. Como ya se ha comentado, se ha trazado el linaje de *Meis1* y *Hoxa13*, se ha analizado su expresión en estadios más avanzados o incluso en la extremidad adulta, y se ha sobreexpresado *Meis2*. A continuación se discuten algunas posibles funciones de estos factores.

#### V.3.1 Función tardía de *Meis/Hox*.

La expresión de *Meis1*, *Hoxa11* y *Hoxa13* en estadios avanzados (Fig. R17) resultó ser específica de estilopodio, zeugopodio y autopodio, respectivamente, y restringida al tejido que rodea el elemento esquelético. Esta restricción ocurría en una secuencia de proximal a distal, ya que en los especímenes jóvenes sólo se apreciaba en estilopodio, en especímenes más avanzados se detectaba en estilopodio y zeugopodio, y sólo en los más tardíos se apreciaba también en autopodio. En cuanto a la función que puedan estar desempeñando, en trabajos anteriores se ha propuesto que los genes *Hox* son promotores del crecimiento de los elementos esqueléticos a través del control de la tasa de proliferación en la zona del cartilago en crecimiento (Goff y Tabin, 1997). Según este modelo, los distintos genes *Hox* competirían por la unión a las mismas dianas, pero las activarían con eficiencias distintas, dando lugar a los distintos tamaños de los elementos que expresan distintos conjuntos de genes *Hox*. Siguiendo este modelo, se podría especular que los genes *Meis* también juegan un papel similar. Además, es razonable pensar (ver Introducción) que todos estos factores de transcripción afectan no sólo a la tasa de proliferación del elemento, sino también a sus propiedades de adhesión, es decir al modo en que interaccionan con las células vecinas, lo que influiría en la forma del elemento y la morfogénesis de las articulaciones (descrito recientemente para los genes *Hox* del grupo 11 (Koyama *et al.*, 2010)). En definitiva, el código *Meis/Hox* de cada elemento podría ser el responsable de la forma y tamaño de ese elemento, aspectos muy poco comprendidos y estudiados hasta el momento.

Además, estos factores se expresan en la extremidad adulta. En el caso de *Meis1*, se observaron algunas diferencias entre neonatos y adultos fértiles. Concretamente, la señal más intensa en el húmero de los neonatos se observó en la placa de crecimiento del hueso, entre la epífisis y la diáfisis, lo que podría sugerir que mientras el hueso sigue creciendo, se requiere la función de los genes *Meis* para que el nuevo hueso se forme con el patrón adecuado. Esta interesante posibilidad podría ser explorada mediante la eliminación condicional de *Meis1* y *Meis2* en etapas postnatales. Una vez el hueso deja de crecer (adultos fértiles), la señal más intensa se observó a lo largo de la diáfisis del húmero, sobre todo en la parte distal. A falta de conocer en qué tejido concreto se localiza la expresión, se puede especular que una posible función de los genes *Meis* en estas etapas sería la del mantenimiento de las propiedades

adecuadas del hueso (adhesión, proliferación) durante el constante recambio tisular. De nuevo, la eliminación condicional de los genes *Meis* podría ayudar a resolver esa pregunta.

La expresión de *Hoxa11* y *Hoxa13* en la extremidad adulta no se ha comprobado en esta tesis, aunque ha sido descrita anteriormente en el periostio de los huesos y en fibroblastos (Rinn *et al.*, 2006; Leucht *et al.*, 2008), y parecen ser importantes para un sistema de memoria posicional.

Si estos factores tienen estas funciones relativamente tardías, cabe la pregunta de por qué se expresan desde estadios tan tempranos, sobre todo en el caso de los genes *Meis*. La respuesta más obvia es que cumplen dos tipos de funciones, una temprana y otra tardía.

### V.3.2 Función temprana de *Meis/Hox*.

Se ha descrito que *Hoxd11*, *Hoxd12*, *Hoxd13* y *Hoxa13* tienen complejos efectos (procondrogénicos o anticondrogénicos) durante la etapa de la formación de las condensaciones (Yokouchi *et al.*, 1995; Goff y Tabin, 1997; Stadler *et al.*, 2001; Kuss *et al.*, 2009), un tiempo antes de los efectos que ejercen sobre el crecimiento del hueso. Por tanto, parece que los genes *Hox* afectan desde el principio a la forma y tamaño de la condensación que se forma en su dominio de expresión. En cuanto a los genes *Meis*, no se puede sacar ninguna conclusión de su falta de función, porque no se han eliminado a la vez *Meis1* y *Meis2*. Su sobreexpresión provoca alteraciones en las condensaciones esqueléticas (este trabajo y (Mercader *et al.*, 1999; Mercader *et al.*, 2009)), que podría ser debido en parte a un efecto directo y en parte a una alteración de la expresión *Hox* ((Mercader *et al.*, 1999; Mercader *et al.*, 2009) y Fig. R39). Para analizar más fondo sus funciones tempranas, se realizó el experimento de *microarrays*.

Tras el análisis de los candidatos, se concluyó que había 6 categorías en las que *Meis2* parecía estar especialmente involucrado. Salvo la categoría de espermatogénesis, las 5 restantes podían tener relevancia en el fenotipo observado. La más representada, con 13 genes en total, era la respuesta inmune, muy probablemente la innata mediada por macrófagos, ya que los neutrófilos murinos no producen alfa-defensinas (Eisenhauer y Lehrer, 1992), los genes de expresión más afectada en el *microarray*. Esto podría significar, entre otras cosas, que las células *Meis2* en la zona distal son reconocidas como algo extraño por alguna especie de sistema de vigilancia y son “atacadas”. En el apartado V.4.2 se trata este hecho más a fondo. La siguiente categoría era la de proteínas asociadas a membrana (receptores de señales, maquinaria de transducción de señales, una integrina...), con 8 genes en total. Es evidente que si *Meis2* afecta las propiedades de adhesión y la respuesta de la célula a su entorno, una forma de hacerlo es modificando el repertorio de proteínas de membrana. La categoría de reorganización del citoesqueleto, representada por 7 genes, juega sin duda un papel fundamental en los cambios de morfología celular, migración y adhesión a un sustrato, pero es muy probable que se trate de procesos secundarios, activados como una consecuencia, más que como la causa directa del cambio de identidad. Otra categoría necesaria para que se produzcan reorganizaciones de tejido sería la de modificadores de la matriz extracelular (ECM), representada por 5 genes. Para que las células puedan migrar y relocalizarse, deben degradar la ECM que las rodea y volver a formarla después. Pero la relación causa–efecto podría también funcionar al revés. Hay evidencias del papel activo de los componentes de la ECM en la morfogénesis de la extremidad (McCulloch *et al.*, 2009; Capehart, 2010; Hudson *et al.*, 2010). Así, quizá la ECM sea una parte importante del código de información posicional, y el cambio de una matriz de carácter distal por una de carácter proximal sea la causa del supuesto “estrés” celular y el cambio en su comportamiento. Por último, había 3 genes en la categoría relacionada con la muerte celular programada. Si realmente las células *Meis2* en posiciones no proximales son atacadas por el sistema inmune, o

simplemente mueren debido al hipotético “estrés” causado por la disparidad de su código de identidad/adhesión con el del entorno, entonces tiene sentido que se activen genes de esta categoría, aunque de nuevo sería un efecto derivado más que uno primario.

Finalmente, aunque es difícil evaluar su contribución al fenotipo de sobreexpresión, se añadió la categoría de modificación de cromatina, con *Brd8* y *Lmo4*, ya que podría tener un papel relevante, sobre todo en el contexto del nuevo modelo de formación de patrón P-D (ver apartado V.5). Especialmente interesante era *Lmo4*, cuyo patrón de expresión descrito es aproximadamente complementario al de los genes *Meis*, lo que correlaciona con el hecho de ser un gen de expresión disminuida en el *microarray*.

Otro filtro importante que había que aplicar a los candidatos era el requisito de que en condiciones normales se expresaran en el primordio de extremidad en algún momento del desarrollo. En estadios tempranos, la regionalización de la expresión normal a lo largo del eje P-D dependería en principio de si el gen estaba en la categoría de aumentados (se esperaría que su expresión normal fuera proximal) o disminuidos (expresión distal esperada). En estadios más avanzados, cuando la vía de señalización de RA, incluyendo *Meis2*, se activa en los interdógitos (Mollard *et al.*, 2000; Crocoll *et al.*, 2002; Hernandez-Martinez *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010), sería esperable que los genes de expresión aumentada se expresaran en condiciones normales en esa región.

Así pues, después de aplicar estos criterios, las categorías sobre las que *Meis2* puede estar influyendo más directamente son: propiedades de adhesión, modificación de la ECM y modificación de cromatina. Todas estas categorías son probablemente relevantes a la hora de definir la identidad posicional proximal de las células, y cuando esa identidad posicional es “forzada” en regiones distales, da lugar al fenotipo observado (que incluye relocalización y muerte celular).

De momento se han analizado unos pocos miembros de cada categoría, y la conclusión es que *Lmo4* e *Itga9* podrían ser dianas de *Meis2*.

## V.4 Propiedades de adhesión en la extremidad.

### V.4.1 Desplazamiento de puntas de extremidad transplantadas en zeugopodio.

Es evidente que la regionalización adecuada de la extremidad requiere que las células pertenecientes a distintos territorios puedan separarse adecuadamente. Tanto para la formación de condensaciones y articulaciones como para la correcta migración de células que invaden el primordio de extremidad, la existencia de un código de atracción y repulsión resulta fundamental. Este código debe además estar directamente relacionado con el sistema de información posicional, para que sea útil a la hora de regionalizar la extremidad. Por otro lado, dada la robustez que requiere el desarrollo de una estructura tan dinámica, el sistema debe permitir que, de hallarse unas células en una posición equivocada, éstas puedan activar mecanismos que suavicen las diferencias posicionales. De hecho, la implantación de una microesfera de RA o de células que sobreexpresan *Meis1* en la parte distal del primordio conduce a una relocalización de las células afectadas, que se mueven hasta la región del codo (Mercader *et al.*, 2000). En esta tesis se ha estudiado de nuevo ese mecanismo, pero sin recurrir (al menos en algunos experimentos) a la sobreexpresión de genes o al tratamiento con señales exógenas. Así, se comprobó que las puntas distales de primordios de extremidad de distintos estadios injertadas en el futuro zeugopodio de HH24 terminaban generalmente en una posición acorde con la estructura que formaban (Tabla VI y Fig. R29). Son destacables dos cosas: cuando los injertos



se transplantaban a la región proximal del primordio, no se observó dicha relocalización, y cuando daban lugar a estructuras A2 o A3, aunque se injertaran en zeugopodio tampoco terminaban en la posición correspondiente, sino en Z3 o como mucho la muñeca. Hay al menos tres posibilidades no excluyentes que explicarían este comportamiento. 1) En experimentos análogos realizados durante el proceso de regeneración en urodelos se ha propuesto que si la diferencia en información posicional es pequeña, las células tienden a moverse para compensarla. No obstante, si la diferencia es “demasiado grande”, en lugar de movimiento compensatorio lo que ocurre es la regeneración intercalar de las estructuras que faltan (Crawford y Stocum, 1988b). Esto podría estar ocurriendo en nuestros experimentos, con la diferencia de que en ausencia de movimiento, en este caso no se produce regeneración intercalar. 2) Podría ocurrir que dentro del estilopodio y del autopodio las propiedades de adhesión estén compartidas por todas sus células, es decir, que sean una característica modular, mientras que en el zeugopodio las propiedades forman un gradiente. Eso explicaría por qué los injertos tratados con RA se mueven como mucho hasta las inmediaciones del codo pero no a regiones más proximales, o por qué los injertos que dan lugar a A2 o A3 no avanzan más allá de la muñeca. No obstante, al menos en el caso del autopodio, esta posibilidad no parece sostenerse si se tiene en cuenta que células pertenecientes a la región indiferenciada de extremidades de HH24 y 26 (es decir, pertenecientes al autopodio en ambos casos), son capaces de segregar en cultivo (Ide *et al.*, 1994). 3) Otra posibilidad es que, incluso en estadios tempranos, las articulaciones supongan un impedimento físico para el movimiento adecuado de los injertos, y por eso se observe que no cruzan más allá de esas estructuras.

En cuanto a los injertos que sí se trataron con RA y la comparación de su posición respecto a los controles, la conclusión principal es que se produce un cambio importante en la distancia entre el injerto y la región inmediatamente distal a él (Fig. R30 y R31). El hecho de que la posición relativa respecto a la marca proximal no cambiara significa que se puede descartar un modelo de movimiento tipo iceberg, en el que el ectodermo se “abre” para dejar paso al transplante y luego se “cierra” detrás de él. La elongación de la marca distal cuando el transplante se proximaliza puede significar que ese movimiento del injerto ejerce una fuerza mecánica sobre el ectodermo del receptor, y que éste responde proliferando en la dirección de la fuerza, dando lugar a la marca alargada observada. No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que el tratamiento con RA también proximalice las células del ectodermo, siendo la causa del fenómeno observado, aunque en ese caso sería más probable que todo el ectodermo afectado se desplazara en bloque, en lugar de dejar un reguero tras de sí. El modelo más plausible que explicaría los resultados observados es que, cuando no hay tratamiento con RA, el injerto y el ectodermo que lo rodea se mueven conforme crece el zeugopodio del receptor, con un ligero desplazamiento respecto a éste para encontrar la región más afín a sus propiedades de adhesión. Sin embargo, cuando se trata con RA, tanto el injerto como la región a la que se ha transplantado quedan “bloqueados” en esa posición, quizá con propiedades de zeugopodio proximal o codo debido a la exposición a RA, mientras que las regiones del zeugopodio del receptor no expuestas a RA se desarrollan con normalidad. Así, la marca distal, al estar “anclada” por el lado del transplante, pero por el lado contrario experimentando la tensión debida al crecimiento de la extremidad del receptor, sufre una elongación.

### V.4.2 Relación entre propiedades de adhesión y eliminación de células localizadas en una región “errónea” de la extremidad.

Respecto a la sobreexpresión de *Meis2* en la extremidad de ratón, realizada en este trabajo, es evidente que provocó cambios en las propiedades de adhesión, como se pudo comprobar por la tendencia al agrupamiento observada tanto en la sobreexpresión aleatoria como en la dirigida

por la línea *Shh*<sup>GFP<sup>Cre</sup>/+</sup>. Como era de esperar, este agrupamiento sólo se observaba en células localizadas en el zeugopodio y el autopodio, regiones en las que en estadios avanzados no se expresa *Meis2*. El fenómeno de subrepresentación en el autopodio en el caso de la sobreexpresión aleatoria podría ser debido a una eliminación de esas células situadas en una región equivocada (quizá debida al ya mencionado hipotético sistema de vigilancia), y/o a la migración de esas células en base a sus diferentes propiedades de adhesión. Teniendo en cuenta que no se observó una ventana de tiempo concreta en la que se produjera una muerte masiva de las células *Meis2* en regiones distales, se podría favorecer más la hipótesis de la migración. No obstante, no se puede descartar con seguridad que se produjera un incremento sutil pero mantenido en el tiempo de la tendencia apoptótica de dichas células. Por otro lado, sí se observó aumento de muerte al sobreexpresar *Meis2* en el linaje de *Shh* (Fig. R36), por lo que se podría pensar que la inducción de muerte celular programada en las células erróneamente localizadas requiere un efecto comunidad, es decir, que estén juntas un número alto de células *Meis2*. Además, debe tenerse en cuenta que aunque el aumento de apoptosis se apreció en todo el linaje de *Shh*, los agrupamientos de varias células apoptóticas sólo se observaron cerca del ectodermo (Fig. R36), por lo que la cercanía a esta estructura también parece ser un factor importante. Por tanto, el modelo que mejor integra los datos disponibles es que **en general las células que sobreexpresan *Meis2* en el autopodio experimentan cierto “estrés” que las lleva a abandonar el autopodio** y dirigirse al zeugopodio/estilopodio, **salvo si se encuentran muy cerca del ectodermo** (algo que ocurre con muchas de las células del linaje *Shh*), en cuyo caso se adhieren a él (Fig. R24d). La explicación de por qué se induce muerte celular programada especialmente en grupos de células *Meis2* adyacentes al ectodermo podría estar relacionada con el sistema de regresión del interdígito, cuyo detonante parece ser la activación de RA/*Meis* en dicha región, lo que induce *Bmp7* (inductor de apoptosis) e inhibe la señalización FGF, necesaria para la supervivencia en la zona subectodérmica (Dupe *et al.*, 1999; Hernandez-Martinez *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010). Así, en nuestros experimentos, al expresar *Meis* bajo el ectodermo, esas células son eliminadas como si fueran interdígito. Es destacable que en la sobreexpresión aleatoria no se ha podido detectar un aumento significativo de muerte celular en los grupos subectodérmicos del autopodio (Fig. R27), lo que podría significar, como ya se ha mencionado, que además de la cercanía del ectodermo, en cualquier caso se requiere también un cierto número de células para que el efecto sea detectable.

Este escenario restaba importancia a la posibilidad de la existencia del mencionado sistema de vigilancia, pero todavía quedaban algunas comprobaciones. Teniendo en cuenta que en el experimento de *microarrays* se había observado un gran incremento de genes relacionados con la respuesta inmune innata (fundamentalmente moléculas que permeabilizan la membrana celular del objetivo) y de algunos mecanismos de defensa contra esa respuesta inmune, existía la posibilidad de que células del tipo macrófago estuvieran invadiendo la región de sobreexpresión de *Meis2*, siendo las causantes de la apoptosis observada. Sin embargo, aunque se detectó cierto aumento del número de células positivas para CD68 y MAC3 en las extremidades experimentales, no parecían estar presentes en una cuantía suficiente para jugar un papel causal. Lo más probable es que, de tener un papel, se limitara a la limpieza de las zonas apoptóticas. Surge entonces la pregunta de por qué se detectó tan aumentada la expresión de genes que tienen un papel activo en la respuesta inmune. Aparte de la posibilidad de que fuera un artefacto debido a las diferencias intrínsecas entre la cepa control y la experimental (algo ya descrito para la producción de defensinas en el intestino (Esworthy *et al.*, 2010)), existen otras dos: esos genes están siendo expresados por células que no son macrófagos (por ejemplo las vecinas de las células apoptóticas), o realmente sí que hay macrófagos infiltrados, pero debido al estadio de análisis, no expresaban todavía MAC3 ni CD68. Respecto a la primera opción, se ha descrito que en mutantes que carecen de macrófagos y neutrófilos, la eliminación del interdígito procede con normalidad porque los fibroblastos

mesenquimales adquieren el papel de fagocitos, y aunque son menos eficientes, su alto número lo compensa (Wood *et al.*, 2000). Además, en otros contextos se ha visto que cuando se da esta situación de sustitución por parte de fagocitos “no profesionales”, éstos no expresan los marcadores específicos de macrófagos, sino otros más generales como CD206 (receptor de manosa) (Linehan *et al.*, 2005). No obstante, el aumento moderado de células positivas para CD206 que se observó al sobreexpresar *Meis2* (Fig. S7) de nuevo apunta más a una consecuencia que a una causa. La segunda opción se explorará en el futuro.

### V.4.3 ¿Un nuevo componente del sistema de adhesión?

Ya se ha comentado en la Introducción que si bien el sistema Eph/efrina y algunas cadherinas presentan algunas características que los hacen candidatos a mediar las propiedades de adhesión en la extremidad, por el momento no se ha encontrado una relación clara entre la expresión/función de sus componentes y la regionalización P-D de esas propiedades. En esta tesis, en lugar de estudiar directamente esas moléculas, se ha abordado el problema desde la perspectiva contraria: sobreexpresar un factor de transcripción que provoca efectos en las propiedades de adhesión y estudiar las variaciones en la expresión génica, para encontrar algún candidato que sea responsable de esas propiedades de adhesión. Entre esos candidatos no se encontraban miembros del sistema Eph/efrina, pero sí ITGA9, cuya distribución se inmunodetectó en la extremidad, algo que no se había descrito. ITGA9 se encuentra mayoritariamente en el tronco y la región proximal de la extremidad, y también en la región subectodérmica de toda la extremidad en general. Además, parece que la sobreexpresión de *Meis2* podría tener un efecto positivo sobre ITGA9, aunque la correlación no se observó en todas las secciones analizadas. Se requerirá un análisis más detallado para determinar cómo se regula la expresión de esta molécula. En cualquier caso, es sugerente que ITGA9 se exprese en la zona subectodérmica, que es precisamente donde los grupos de células que sobreexpresan *Meis2* tienden a adherirse. Por tanto, entra dentro de lo posible que el sistema de integrinas también juegue un papel en las propiedades de adhesión de la extremidad. En ese sentido es destacable que la función de otro miembro de la familia, ITGA8, es fundamental en el reclutamiento de células mesenquimales a estructuras epiteliales durante la morfogénesis del riñón (Muller *et al.*, 1997), que *Itga8* es una diana transcripcional de *Hoxa11* en esa estructura (Valerius *et al.*, 2002) y que se expresa en la extremidad superior de *Xenopus* pudiendo ser importante para su inducción (Abu-Daya *et al.*, 2010). Pese a todo, ni el ratón con falta de función de *Itga9* ni el de *Itga8* parecen tener un fenotipo anómalo en la extremidad, aunque dicha estructura no fue analizada en profundidad (Muller *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2000).

## V.5 Recopilación e integración de los datos disponibles.

### V.5.1 Modelo híbrido de desarrollo P-D de la extremidad.

Los datos preexistentes acerca del efecto de señales difusibles en la extremidad (Mercader *et al.*, 2000; Yashiro *et al.*, 2004; Mariani *et al.*, 2008) podían sugerir que un modelo combinatorio estaba operando en la formación de patrón P-D. Así, se ha sugerido que quizá las células son especificadas como estilopodio cuando reciben mayoritariamente señales proximales, como zeugopodio cuando reciben cantidades similares de señales proximales y distales, y como autopodio cuando principalmente reciben señales distales (Tabin y Wolpert, 2007). Pese al carácter atractivo y tentador del modelo combinatorio, el trabajo desarrollado en esta tesis indica que no puede ser del todo correcto, especialmente en lo que se refiere a la especificación del

autopodio. A continuación se describe paso a paso el modelo propuesto en este trabajo (Fig. D3a):

- Inicialmente, antes de la expresión de *Fgf8* en el AER, *Raldh2* se expresa en todo el territorio del futuro primordio de extremidad. Así, sólo hay señalización de RA, de modo que *Meis1/2* y *RARβ* se expresan también en todo ese territorio (Fig. D2 y D3a izquierda). Es posible que en este momento se estén especificando los destinos de cadera y escápula, ya que éstas estructuras son sensibles a la falta de RA (Mercader *et al.*, 2000), pero no a la ausencia de FGFs del AER (Mariani *et al.*, 2008).

- Unas horas después ya se puede detectar la expresión de *Fgf8* en el ectodermo. Probablemente como consecuencia, se inhibe la expresión de *Raldh2* en la parte distal del mesénquima (Mercader *et al.*, 2000) (Fig. D2). La señalización FGF es todavía muy baja (no hay *Sprouty2* o *AP2*, Fig. D2), de modo que el equilibrio RA/FGF está desplazado hacia RA, y por eso *Meis1/2* y *RARβ* se detectan todavía en todo el territorio de la extremidad. Probablemente se esté especificando el destino de estilopodio. Esta proposición de que la especificación del estilopodio requiere una señalización FGF muy baja se basa en los experimentos con recombinantes o con inhibidor de FGFR1, y en el hecho de que el linaje de las células que expresan *AP2* (una diana de FGF (Shen *et al.*, 1997)) no se extiende hasta el estilopodio en los estadios tempranos (Li *et al.*, 2005). Nótese que ésta es una diferencia importante con el modelo propuesto por Mercader y colaboradores, en el que se asumía que cuando se enfrentaran niveles altos de señalización de RA y FGF, el efecto de RA se imponía (Mercader *et al.*, 2000).

- Como ya se ha comentado, cuando los niveles de señalización de FGF suben (ya se detecta expresión de *Sprouty2*, Fig. D2), la expresión de *Meis1/2* y *RARβ* se inhibe en la parte distal. (Fig. D3a, segundo dibujo). Esto ocurre muy temprano, antes de que haya un crecimiento notable de la extremidad, por lo que insisto en el punto de que lo que normalmente se consideran estadios muy tempranos (HH19-20), están en realidad bastante avanzados, y por tanto no sirven para obtener conclusiones sobre la formación en las etapas más tempranas del desarrollo de la extremidad.

- Concomitantemente, o tal vez poco después, la expresión de *Hoxa11* ya se detecta en la parte distal (Fig. D2 y Fig. D3a, tercer dibujo). Probablemente ha empezado la especificación del zeugopodio. Es destacable que esta expresión de *Hoxa11* es reversible, de modo que si se inhibe la señalización FGF en este momento, el RA que difunde desde el flanco es capaz de activar de nuevo *Meis1* (este trabajo y (Mercader *et al.*, 2000)). Además, como en el modelo del frente de diferenciación, proponemos que la especificación del estilopodio se hace efectiva en este momento, en el que las células que expresan *Meis1/2* han salido de la zona indiferenciada y por tanto van a comenzar en breve el programa de diferenciación, de acuerdo con las características que les confieren los factores que expresan. Es en este momento cuando los precursores de estilopodio son más sensibles a la irradiación (Galloway *et al.*, 2009). Aquí acaba la Fase 1.

- Como ya se ha mencionado, la apertura progresiva de la cromatina es un parámetro importante en la expresión colineal de los genes *Hoxd* en el eje principal del cuerpo (Soshnikova y Duboule, 2009). Además, en pez cebra, *Meis3* afecta la transcripción de varios genes a través de cambios en la maquinaria que modifica la estructura de la cromatina (Choe *et al.*, 2009), y en esta memoria se ha descrito que *MEIS2* podría regular la expresión de modificadores de la cromatina como *Lmo4* (Fig. R38). Por último, ya se ha comentado que la sobreexpresión de los genes *Meis* retrasa la evolución de la expresión Hox en la extremidad. Sumando estas evidencias,

proponemos que los factores MEIS, directa o indirectamente actúan a nivel de la estructura de la cromatina como un freno para la expresión de los genes 5' *Hox* (por ejemplo *Hoxa13* en el *cluster* HoxA), de modo que hasta que no cesa la expresión de *Meis1/2* en la parte distal, la apertura de la cromatina del *cluster* no puede continuar. Esta apertura de la cromatina sería un proceso fundamentalmente autónomo (Fase 2), y por tanto el tiempo que transcurre entre la activación de *Hoxa11* y la de *Hoxa13* es esencialmente constante. Mientras tanto, las células que expresan *Hoxa11* ya han abandonado la zona indiferenciada y su identidad queda fijada como zeugopodio. Si la irradiación se produce en este momento, se pierde el segmento intermedio (Galloway *et al.*, 2009).

- Un aspecto *a priori* difícil de explicar por el modelo es por qué la expresión inicial de *Hoxa13* está sesgada hacia la región posterior. Una posible explicación es que pese a que *Shh* no parece ser necesario para la expresión de *Hoxa13* en el mesénquima (Hashimoto *et al.*, 1999), quizá para esta expresión inicial sí que sea necesaria la cercanía al ectodermo posterior de la extremidad (Fig. R19). Además, CYP26B1 podría tener un efecto importante en esta activación inicial, pero sobre todo en la expansión del dominio de expresión de *Hoxa13* por activación *de novo* (Fig. R22). El hecho de que la degradación de RA endógeno sea necesaria para la correcta expansión de *Hoxa13* parece ir en contra de la propuesta de que la Fase 2 es autónoma, pero en realidad se trataría más de un mecanismo de refinamiento que del motor principal del proceso. Si la expresión de *Hoxa13* dependiera sólo de que la señalización de RA se reduzca a cero, es decir, de que sea degradado por CYP26B1, entonces la aplicación de RAA en cantidad suficiente podría provocar su activación precoz, y no es el caso (Fig. R19). Por otro lado, la inhibición de la degradación de RA conseguida en este trabajo no tiene consecuencias en los elementos esqueléticos, al contrario que cuando se elimina *Cyp26b1* en ratón (Yashiro *et al.*, 2004; Pennimpede *et al.*, 2010), por lo que es probable que sólo se estuviera consiguiendo una inhibición transitoria, y/o que CYP26B1 no sea tan importante en pollo como en ratón.

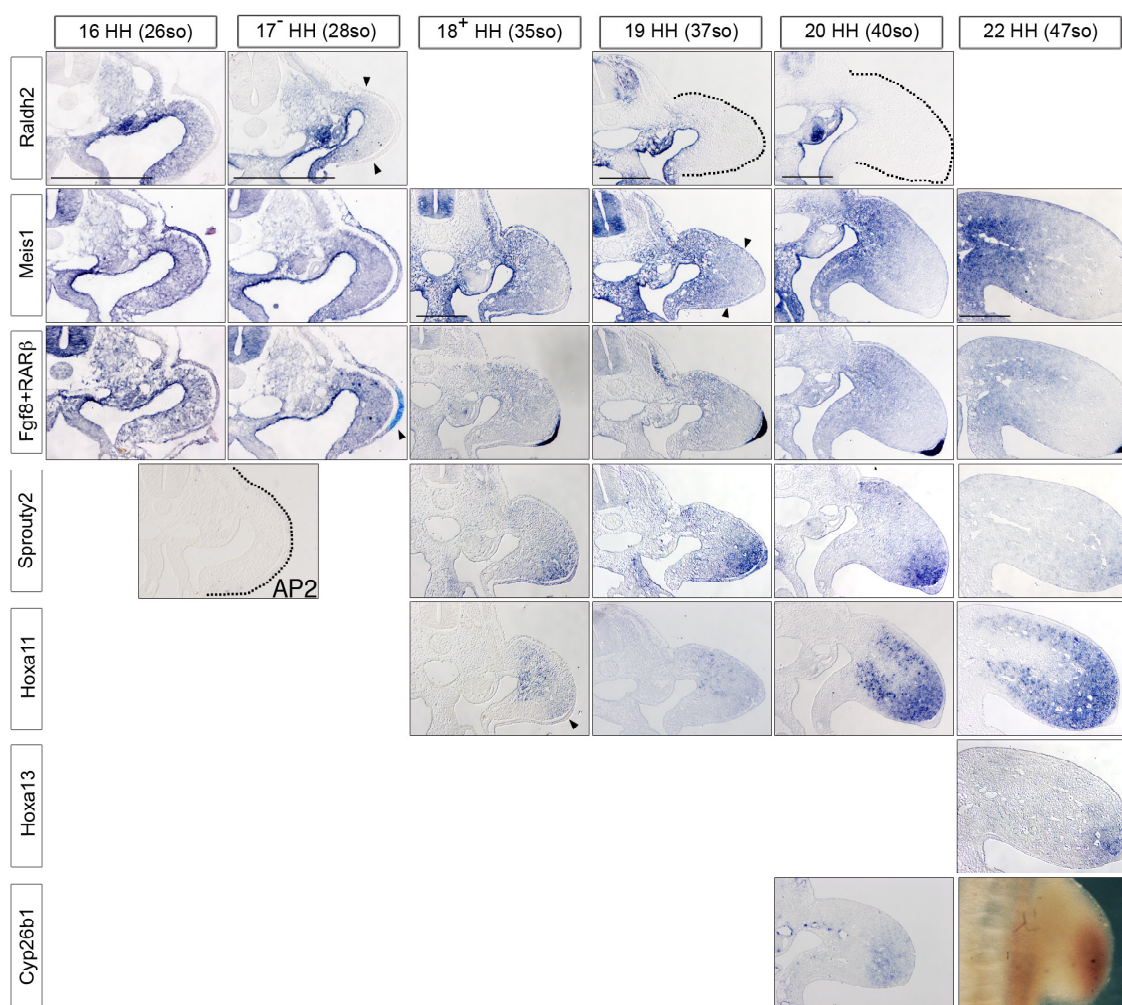
- Cuando debido al crecimiento de la extremidad los dominios de expresión de los marcadores P-D quedan alejados de las señales que los controlan, es posible que la inhibición entre ellos sea el mecanismo que mantiene constantes sus límites (Capdevila *et al.*, 1999).

- La activación de *Hoxa11* por FGF probablemente es dependiente de contexto, porque en las etapas más avanzadas, *Hoxa11* se inactiva en la región distal, pese a que se mantiene la señalización FGF, y además *Hoxa11* no requiere los FGFs del AER para su mantenimiento (este trabajo y (Vargesson *et al.*, 2001)). Entre otras, una causa podría ser que los genes 5' *Hoxd* y *Hoxa13* son capaces de inhibir *Hoxa11* (Marian Ros y Rushikesh Sheth, comunicación personal). Como consecuencia de estas interacciones, se forman los tres dominios de expresión.

- Dentro del territorio del autopodio, la distinción entre carpos/tarsos y el resto de estructuras se debe probablemente a *Hoxa13*, que se activa por etapas en los distintos precursores de los elementos del autopodio, y es el único 5' *Hox* que se expresa en la región de la muñeca/tobillo cuando ésta es distinguible (Woltering y Duboule, 2010). Los 5' *Hoxd* se expresan en distintas regiones del resto del autopodio, de acuerdo con la colinearidad invertida ya comentada, y podrían afectar tanto al número de condensaciones (dedos) como a las propiedades celulares de las mismas. Además, es posible que para la generación de las falanges participe un oscilador molecular, basado en la expresión cíclica de *Hairy2* (Pascoal *et al.*, 2007). A favor de este mecanismo están los hechos de que los dedos que crecen (reciben señalización de FGF8) por más tiempo son los que más falanges tienen (Sanz-Ezquerro y Tickle, 2003), se puede aumentar el número de falanges de un dedo prolongando su crecimiento mediante implantación de



microesferas cargadas con FGF8 (Sanz-Ezquerro y Tickle, 2003), y en algunos cetáceos se dan casos de hiperfalangismo relacionados con un proceso similar (Richardson *et al.*, 2004).

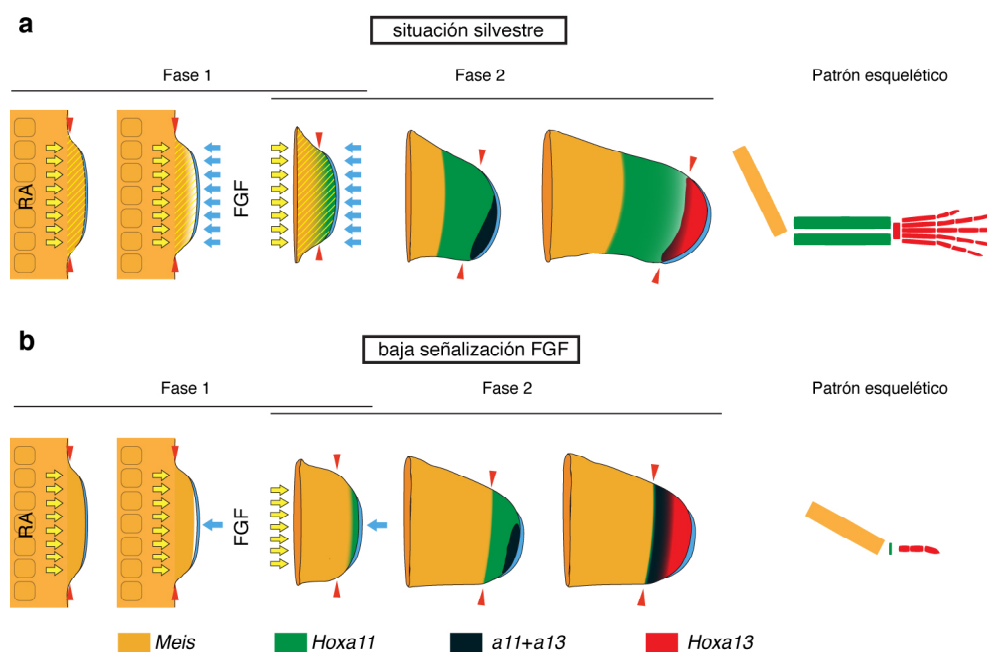


**Figura D2.** Hibridación *in situ* de los transcritos de genes importantes para la formación de patrón P-D, en secciones adyacentes de primordios de ala de pollo en los estadios indicados. Las puntas de flecha señalan el primer atisbo de expresión de *Fgf8* y *Hoxa11*, o el límite distal de *Raldh2* y *Meis1*. La expresión de *Fgf8* en estadio HH17<sup>-</sup> pertenece en realidad a otra sección adyacente, pero se ha sobreimpresionado en la sección mostrada para mantener la coherencia en la estructura de los paneles. Nótese la dinámica de la retirada de *Raldh2*, *Meis1* y *Rarβ* de la región distal (derecha) del primordio, y cómo correlaciona con la expresión de *Fgf8* y/o de su diana *Sprouty2* (Minowada *et al.*, 1999). La sección de *Cyp26b1* en HH20 (el primer estadio en el que se detecta con esta técnica) pertenece a otro espécimen, y en HH22 se muestra en *whole-mount* para que se aprecie que su expresión en la región posterior está reducida. Las barras de escala equivalen a 250 micras. En un caso en vez de expresión de *Sprouty2* se muestra de *AP2*. Para una serie equivalente en ratón, ver (Mercader *et al.*, 2009).

En cuanto a cómo explicaría este modelo algunos de los resultados de la literatura, los truncamientos tras la eliminación del AER se explican de un modo similar a como ya se ha hecho con otros modelos. Bien debido al aumento de muerte y bajada de proliferación en la zona subapical, y/o a que se produce una diferenciación precoz, no se producen suficientes progenitores del elemento que se estaba especificando, de modo que su formación fracasa. La explicación de por qué el mutante de *Fgf8* puede dar lugar a una ausencia casi total de estilopodio (Lewandoski *et al.*, 2000; Moon y Capecchi, 2000), podría radicar en una combinación de la alta muerte proximal observada y una disminución del reclutamiento temprano de células al primordio de la extremidad, como propusieron Sun y colaboradores (2002). Pero el

## V. DISCUSIÓN

fenotipo más difícil de explicar para un mecanismo progresivo es la pérdida de zeugopodio, pero no de estilopodio y autopodio, cuando la señalización FGF está extremadamente disminuida (Mariani *et al.*, 2008). El modelo bifásico puede explicarlo de la siguiente manera (Fig. D3b): la eliminación de varios *Fgfs* con la línea *Msx2-Cre* provoca que la señalización FGF comience en el estadio adecuado, pero que después no alcance los niveles normales, sino que se queda muy reducida. Así, *Meis1* se inhibe y *Hoxa11* empieza a expresarse en el momento normal, pero en una región mucho más reducida, que no se expande en los estadios siguientes debido a la insuficiente señalización FGF. La inactivación de *Meis1* pone en marcha la Fase 2 en esas pocas células distales, de modo que cuando pasa el tiempo normal, *Hoxa13* se activa. El punto importante es que para cuando *Hoxa13* se activa, debido a la escasa expansión del dominio *Hoxa11*, las células *Hoxa11*<sup>+</sup> todavía no han logrado salir de la región indiferenciada. La expresión de *Hoxa13* se extiende mientras tanto por la región indiferenciada, hasta que llega un momento que ocupa toda la región que expresa *Hoxa11* (Fig. D3b). Así, cuando estas células cruzan el frente de diferenciación, su código *Hox* ya no les permite dar lugar a un zeugopodio. El hecho de que sólo se forme un dedo puede ser debido a que el eje A-P del primordio y la señalización SHH están muy reducidos (Mariani *et al.*, 2008).



**Figura D3.** El modelo bifásico permite explicar fenotipos *a priori* irreconciliables con un modelo progresivo. **a**, Situación silvestre. Los dominios de expresión aparecen coloreados como se indica. Las flechas amarillas y azules representan la señalización RA y FGF, respectivamente. El patrón de rayas amarillas representa la distancia efectiva a la que puede difundir RA, aunque en la parte distal su señalización esté bloqueada por la de FGF. Después de la Fase 1, esa región ya no se ha dibujado. Las puntas de flecha rojas indican el frente de diferenciación. **b**, Mismo tipo de representación, pero en condiciones en que la señalización FGF está muy disminuida. Nótese que el dominio de expresión de *Hoxa11* se expande mucho menos que en la condición silvestre, de modo que cuando *Hoxa13* se activa, pronto ocupa gran parte de la extensión que ocupaba *Hoxa11*. Para facilitar la visualización, los primordios de la Fase 2 no están representados a escala. Su tamaño real es mucho menor que el de los primordios equivalentes de la condición silvestre (Mariani *et al.*, 2008).

Una predicción del modelo es que el tratamiento con RA o la sobreexpresión de *Meis1/2* desde estadios tempranos debería provocar un retraso en la expresión de *Hoxa11* y por tanto de *Hoxa13*, además de una restricción de su expresión a regiones más distales. Dicha restricción de la expresión sí que ha sido observada anteriormente (Mercader *et al.*, 1999; Mercader *et al.*, 2000; Mercader *et al.*, 2009), pero el análisis detallado de la sobreexpresión de *Meis1* en la

extremidad de ratón condujo a la conclusión de que no había retraso en el comienzo de la expresión de esos genes (Mercader *et al.*, 2009). Hay varias posibles explicaciones para ello. Una sería que, si bien para alterar las propiedades celulares MEIS1 puede actuar independientemente de PBX1 (Mercader *et al.*, 2009), quizá para ejercer sus efectos sobre la estructura de la cromatina sí que requiere este cofactor, cuya expresión se restringe a la zona proximal desde muy temprano (Capellini *et al.*, 2006). Otra posibilidad es que *Meis1/2* no ejerzan ese papel directamente, sino a través de alguna de sus dianas, y que éstas estén reguladas a su vez de forma inversa por otros factores, como por ejemplo FGF. Si la sobreexpresión de *Meis1* no es lo suficientemente fuerte como para contrarrestar el efecto contrario ejercido por FGF, entonces no podrá tener gran efecto sobre el momento en que se abre la cromatina del *cluster* HoxA. Es destacable que *Lmo4*, descrito en esta tesis como posiblemente reprimido por *Meis2*, es activado por FGF8, al menos en el embrión de pez (Lane *et al.*, 2002).

Finalmente, resulta interesante mencionar que es posible que este modelo pueda ser aplicado a otros sistemas en los que RA y FGF juegan papeles antagónicos, como el romboencéfalo o el primordio de cola en el eje principal del cuerpo, lo que abre un nuevo abanico de posibles interpretaciones de los datos existentes y venideros.

### V.5.2 Reflexión sobre los marcadores P-D, la especificación y la identidad.

Durante mucho tiempo se han buscado aquellos genes que participan en la especificación de distintos destinos durante el desarrollo embrionario. Es decir, aquellos factores que instruyen a las células que los expresan para formar una estructura o región embrionaria concreta. En la extremidad en particular, ya se ha argumentado anteriormente que los marcadores P-D tipo *Meis1*, *Hoxa11* o *Hoxa13* no son genes que especifiquen una u otra identidad P-D, sino un reflejo de esta identidad, es decir un reflejo del estado de especificación. Por tanto, todavía se están buscando dichos genes responsables de la especificación. Sin embargo, pese a que este concepto resulta muy útil para el pensamiento abstracto y la elaboración de modelos (y se ha usado con frecuencia en esta memoria), quizá no sea aplicable a la extremidad. Si bien hay algunas estructuras o tejidos embrionarios cuyo programa genético está totalmente controlado o iniciado por un solo gen (los llamados genes de control maestro), esta situación parece no darse en la extremidad. De momento, a falta de eliminar a la vez *Meis1* y *Meis2*, no se ha descubierto ningún gen que reúna las condiciones de expresarse con la regionalización adecuada y de que su falta de función implique la ausencia total de uno de los segmentos P-D desde el principio de su desarrollo. Como mucho, lo que ocurre es que la condensación inicial se forma correctamente, pero no crece ni se diferencia adecuadamente. Teniendo en cuenta todos los datos de la literatura, parece evidente que la combinación de mecanismos autónomos y no autónomos es la responsable de la inducción de los genes *Meis*, *Hox*, *Shox*, *Hairy2*... con un patrón espacio-temporal concreto. Es decir, los mecanismos que se ponen en marcha cuando el campo de la extremidad es inducido (equilibrio RA/FGF, apertura de la cromatina) son los responsables de activar, con un patrón muy controlado, la expresión de factores de transcripción de los que a su vez dependen las propiedades celulares que definen el tamaño y forma de los elementos. Según esta visión, en cada región de la extremidad se da una combinación particular de estos factores, no porque un gen maestro la haya especificado para formar uno u otro elemento, sino porque su situación espacio-temporal en el campo en desarrollo es única. En este punto surgen una variedad de escenarios, cuyos ejemplos extremos serían los siguientes: 1) La identidad de los elementos depende exclusivamente del historial de señales que han recibido sus precursores, de modo que cualquier factor *Meis/Hox* podría dar lugar a las funciones celulares necesarias para formar ese elemento. Así, el hecho de que cada elemento exprese una combinación particular de esos factores sería sólo circunstancial. 2) Esta combinación particular

de factores de transcripción sí que es totalmente responsable de la identidad, ya que da lugar a unas propiedades celulares exclusivas en esa región, y como resultado se forma un elemento que tiene una forma y tamaño diferente al resto. Una explicación análoga se podría dar en el caso de estructuras no esqueléticas, como músculos o tendones. Teniendo en cuenta que se ha descrito que cada gen *Hox* afecta de manera distinta las propiedades celulares, y que no son necesariamente intercambiables en sus funciones (Yokouchi *et al.*, 1995; Goff y Tabin, 1997; Zhao y Potter, 2001; Kuss *et al.*, 2009), parece más probable el segundo escenario. Sin embargo, la situación real es más compleja y no tan extrema, ya que también se ha demostrado que la correcta articulación y maduración de los elementos esqueléticos depende de su interacción con la musculatura activa (Nowlan *et al.*, 2010).

### V.6 Evolución de la extremidad.

En éste y otros trabajos se ha mostrado que la vía endógena de señalización de RA es necesaria para la formación del estilopodio y la expresión de *Meis1* en la extremidad de vertebrados. Si realmente la extremidad de vertebrado y la de los Artrópodos son estructuras que comparten una homología profunda en sus redes génicas, tal vez sería esperable que la regulación de estos genes fuera similar.

Respecto a la vía de señalización de retinoides en invertebrados, uno de los datos más interesantes consiste en el descubrimiento de que, si el disco imaginal de *Drosophila* resulta dañado durante el desarrollo larvario, esta vía de señalización se activa para ralentizar el desarrollo de la larva, y así dar tiempo a que el disco se repare (Halme *et al.*, 2010). En vertebrados se da cierto paralelismo, ya que durante la regeneración de la extremidad en anfibios, uno de los primeros efectos del tratamiento con RA es retrasar el comienzo de la regeneración, que subsiguientemente da lugar a destinos más proximales que los que faltaban (Maden, 1983a; Mercader *et al.*, 2005). Es más, los efectos de RA durante el desarrollo se podrían interpretar como un retraso o bloqueo en el proceso progresivo de distalización (Mercader *et al.*, 2000).

Sin embargo, hasta donde llega el conocimiento del doctorando, los mutantes de *Drosophila* en genes de la vía de síntesis de retinoides (como *aldh*) no tienen defectos en el desarrollo, sino sólo en el sistema de visión y en el mencionado retraso en la transición hacia pupa cuando los discos imaginales resultan dañados (Halme *et al.*, 2010). Además, en la larva y el adulto, tanto *adh* (*alcohol dehydrogenase*) como *aldh* (*aldehyde dehydrogenase*) juegan otros papeles distintos, como la resistencia al etanol, una función muy importante en un animal que se alimenta de fruta que puede haber empezado a fermentar (Fry y Saweikis, 2006).

Así pues, a falta de que se inactiven a la vez los distintos genes que podrían estar actuando redundantemente (como *aldh* y *aldh-III*), no parece que *hth* (el ortólogo de *Meis*) esté bajo el control de la vía de retinoides, pero las enzimas necesarias para esa vía sí estaban presentes en el antecesor de protostomados y deuterostomados (ver Introducción). Un escenario atractivo es que parte de la red génica que ya existía para la formación de apéndices en invertebrados quedó bajo el control de la vía de retinoides en algún momento durante la evolución, y ello permitió dar lugar a patrones más complejos y elaborados. Después de todo, la formación de patrón en los apéndices de los Artrópodos ocurre en la cutícula, mientras que en las extremidades de los vertebrados ocurre tanto en ectodermo como en mesénquima, y la formación de patrón en este último, un tejido tridimensional, no parece que pueda depender únicamente de los mecanismos que operan en un epitelio plano.

## **VI. CONCLUSIONES**





1. *Hoxa13* es un marcador exclusivamente de autopodio entre los días de desarrollo E10 y E12. El linaje de las células que lo expresan se expande por etapas en lugar de progresivamente, de modo que contribuye inicialmente a los dedos 2 a 5, luego al dedo 1 y finalmente a los carpos/tarsos.
2. El linaje de las células que expresan *Meis1* se va restringiendo conforme avanza el desarrollo de la extremidad. Inicialmente (~E9) se extiende por todo el eje P-D, y más adelante (~E11) se restringe a la parte proximal del estilopodio.
3. En la extremidad de pollo, *Meis1*, *Hoxa11* y *Hoxa13* se expresan rodeando los elementos esqueléticos ya diferenciados de estilopodio, zeugopodio y autopodio, respectivamente. Esta memoria posicional permite la identificación inequívoca de los elementos esqueléticos, incluso cuando su manipulación provoca que estén deformados. Además, este código puede resultar útil para la interpretación de cambios evolutivos.
4. *Meis1* se expresa en la extremidad adulta del ratón, en los elementos esqueléticos proximales, lo que junto con otros datos de la literatura sugiere que incluso en la etapa adulta se mantiene la memoria posicional.
5. El ácido retinoico (RA) endógeno puede reprogramar las células distales de la extremidad hacia destinos más proximales, siempre que la señalización FGF sea suficientemente baja.
6. La expresión de *Meis1* responde directamente a RA y FGF, y la de *Hoxa11* responde directamente a FGF. Por el contrario, la expresión de *Hoxa13* no responde directamente a ninguna de las señales ensayadas, y su activación siempre ocurre un tiempo después de la de *Hoxa11*.
7. El proceso de formación de patrón P-D puede explicarse mediante un proceso bifásico. La primera fase (transición *Meis1/Hoxa11*) está gobernada por mecanismos no autónomos, especialmente las acciones opuestas de RA y FGF. La segunda fase (transición *Hoxa11/Hoxa13*) comienza como consecuencia de la inhibición de *Meis1*, y depende de un mecanismo esencialmente autónomo.
8. La expresión ectópica de *Meis2* provoca un comportamiento celular anómalo basado en parte en cambios en las propiedades de adhesión intercelular. Estas propiedades varían en distintas regiones de la extremidad y se manifiestan sobre todo a la largo del zeugopodio.
9. ITGA9 podría ser una de las dianas de *Meis2* involucrada en el código de adhesión, aunque su regulación parece depender también de otros factores.



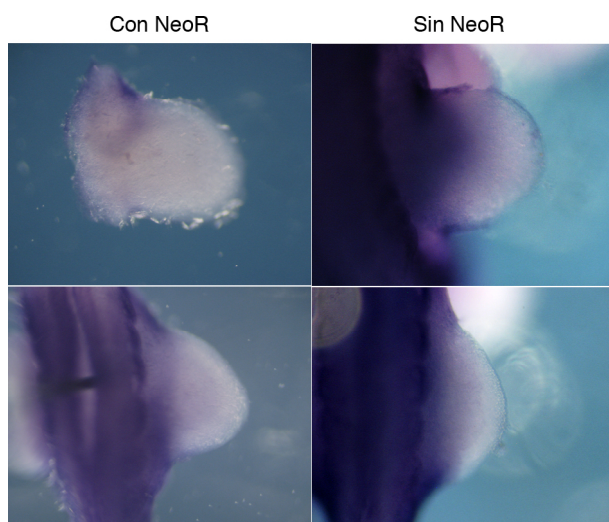
## **VII. MATERIAL SUPLEMENTARIO**





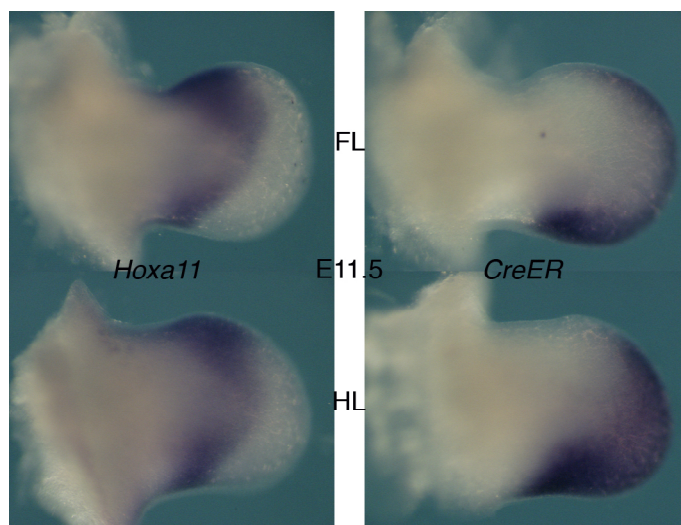
## VII.1 Expresión de *CreER<sup>T2</sup>* en las líneas generadas.

### VII.1.1 Comparación de la expresión con NeoR y sin NeoR en la línea *Meis1<sup>CreERT2/+</sup>*.



**Figura S1.** La presencia del *cassette* NeoR afecta los niveles de expresión del transgén *CreER<sup>T2</sup>*. A pesar de que los niveles de expresión son difíciles de comparar mediante la técnica de hibridación *in situ*, sí que parece evidente que la presencia del *cassette* NeoR (izquierda) provoca que *CreER<sup>T2</sup>* se exprese menos intensamente que cuando está ausente (derecha), sobre todo en la extremidad superior (arriba). La tinción de los especímenes de la izquierda se reveló más tiempo que en los de la derecha, por lo que la diferencia encontrada no puede ser debida a un revelado más prolongado de los que no tenían NeoR.

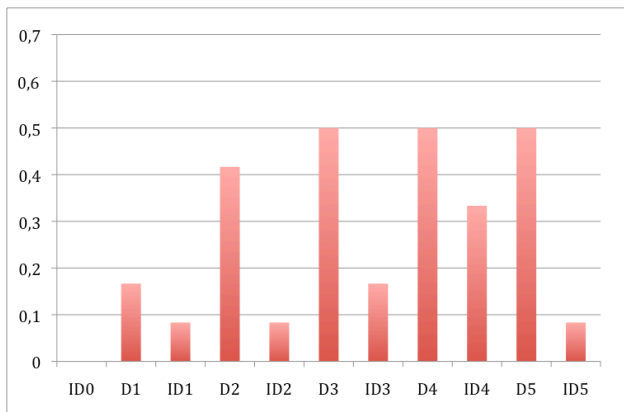
### VII.1.2 Expresión de *Hoxa11* y *CreER<sup>T2</sup>* en especímenes más avanzados de *Hoxa11<sup>CreERT2/+</sup>*.



**Figura S2.** Expresión de *Hoxa11* en especímenes silvestres (izquierda) y de *CreER<sup>T2</sup>* en especímenes *Hoxa11<sup>CreERT2/+</sup>* (derecha) a E11.5. FL, HL = extremidad superior e inferior, respectivamente.

## VII.2 Marcaje temprano del linaje *Hoxa13*.

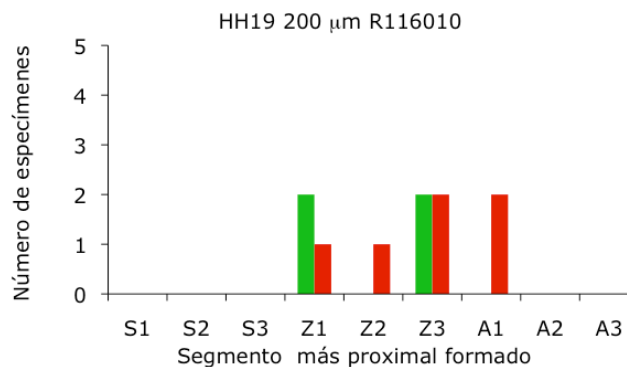
### VII.2.1 Datos incluyendo una camada más avanzada.



**Figura S3.** Distribución de la frecuencia de clones obtenidos con el marcaje más temprano del linaje *Hoxa13*. Además de las 6 extremidades incluidas en la Figura R4, en ésta se incluyen datos de otras 6 extremidades que estaban un poco más avanzadas de lo deseado.

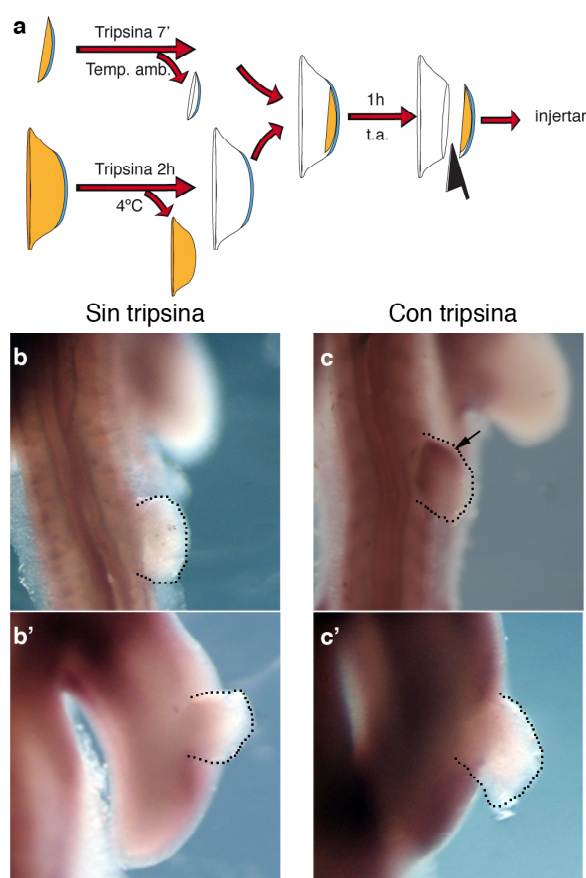
## VII.3 Experimentos adicionales con puntas distales de primordio de extremidad.

### VII.3.1 Inhibición de CYP26 en trasplantes de 200 micras.



**Figura S4.** La inhibición de la degradación de RA en los trasplantes de 200 micras no provoca grandes diferencias en el resultado, independientemente de dónde se trasplanten. Los trasplantes llevaban incorporada una microesfera cargada con 10 mg/ml de R116010, un potente inhibidor de CYP26. Recuérdese que en este estadio la variabilidad es bastante acusada, por lo que las pequeñas diferencias observadas entre los injertados en somitos (verde) y en zeugopodio (rojo), no parecen ser significativas.

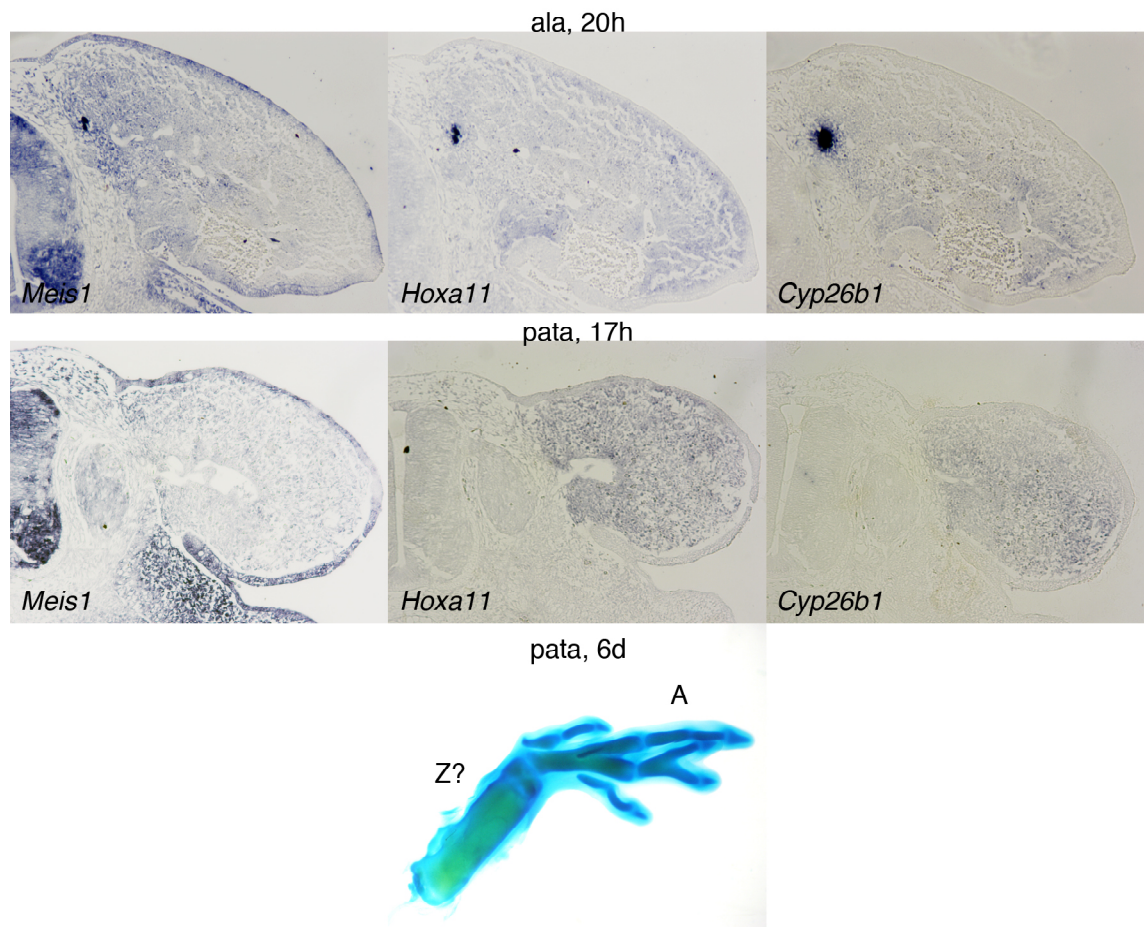
## VII.3.2 Tripsinización y sustitución de ectodermo en trasplantes de punta distal.



**Figura S5.** Puesto que la generación de recombinantes implica mucha manipulación, cabe la pregunta de si dicha manipulación *per se* puede provocar algún efecto en la formación de patrón, independientemente de dónde se trasplante. **a**, Para comprobarlo, las puntas distales de varios donantes de HH19-20 se trataron con tripsina, igual que se hace para obtener el mesodermo que forma las extremidades recombinantes. Tras quitarles el ectodermo, en lugar de disgregar las células, el mesénquima se recombinó con el ectodermo de otro donante, y tras cortar el tejido sobrante, se transplantó a somitos o zeugopodio. **b – c'**, 20-24 horas tras la operación, se analizó la expresión de la diana de RA  $RAR\beta$ . Como era de esperar,  $RAR\beta$  no se activó en los injertos sin tratamiento (**b, b'** 200 micras,  $n>5$  en cada condición), ni tampoco en los “tripsinizados” que fueron injertados en zeugopodio (**c'**, 100 micras,  $n=2$ ). Sin embargo,  $RAR\beta$  sí se activó en una restringida región proximal de los injertos tripsinizados transplantados a somitos (**c**, 100 micras,  $n=2$ ). El hecho de que los injertos experimentales fueran más finos que los controles aseguraba que la expresión de  $RAR\beta$  en los experimentales no se debía a haber cogido tejido más proximal que en los controles. Esto significa que el tratamiento con tripsina sensibiliza de alguna manera al trasplante para responder a las señales proximales. No obstante, tras varios días de desarrollo, los injertos tripsinizados transplantados a lugares proximales no dieron nunca lugar al estilopodio ni a elementos más proximales de lo esperado ( $n= 6$  de 100 micras, 7 de 200 micras), sugiriendo que el efecto de la tripsina era sólo muy pasajero, y luego los trasplantes recuperaban su refractariedad a las señales proximales.

VII.4 Experimentos adicionales con recombinantes.

VII.4.1 Recombinantes con mesénquima de pata.



**Figura S6.** Las extremidades recombinante hechas con mesénquima de pata no se comportan igual que las que tienen mesénquima de ala. El origen del tejido y el tiempo tras la operación se indican en la parte superior de cada fila de paneles. Posiblemente debido a la heterocronía entre ala y pata, el mesénquima de pata ya expresa y mantiene *Cyp26b1*, y al transplantarlo a somitos no activa *Meis1*, sino que mantiene *Hoxa11* en todo el eje P-D del recombinante (n=2). Además, cuando se dejan crecer seis días, estas extremidades no forman tres elementos, sino sólo dos (n=2), siendo el proximal más probablemente un zeugopodio (Z?). A= autopodio. La relevancia de este resultado se discute más adelante en esta sección.

VII.5 Sobreexpresión de *Meis2*.

VII.5.1 Tabla S1. Datos crudos del recuento de células *Meis2* y LacZ.

	Cls./ grupo	E1_1-2	E1_1-5	E1_2-1	E1_2-4	E1_3-1	E1_3-4	E1_4-1	E1_4-4	E4_1-1	E4_1-2	E4_2-3	E4_2-3'	E4_3-2	E4_3-2'	E4_4-3	E4_4-3'
Autopodio	LacZ 1	246	154	322	203	495	458	487	324	411	544	365	364	654	565	630	478
	2	28	23	24	38	44	38	42	22	59	69	54	42	66	38	77	29
	3	14	8	4	5	6	8	8	6	10	15	12	11	5	3	9	7
	4	0	3	0	2	3	2	1	0	5	3	3	3	1	1	5	1
	5	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	2	0	1	1	1	0
	6	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
	7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

# VII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

GFP	8	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6 a	0	0	0	3	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	> 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	LacZ	1	15	16	22	15	31	55	97	62	64	111	59	58	127	99	85	55
		2	7	1	4	4	4	1	6	8	6	10	8	7	9	7	9	9
		3	3	1	2	2	2	1	3	2	1	0	3	2	0	1	2	0
		4	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	2	1	0	1	2
		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
		6	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	1	1	0	0	0
		7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
		9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		10	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
11		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
12		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
13		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
14		0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
15		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
16		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	
17		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
18		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
19		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
20		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
21		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
22		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
23		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
24		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
25		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
26		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
27		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
28		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
29		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
30		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6 a		0	0	0	0	0	0	2	0	1	1	2	2	1	0	0	1	
10		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
> 10		1	0	0	4	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	1	0	
Zeugopodio		1	86	72	102	154	92	102	90	135	127	134	107	139	157	125	146	140
		2	23	13	11	15	16	14	12	19	12	14	7	9	18	8	20	5
		3	6	0	0	2	1	3	1	5	4	3	2	0	2	1	1	2



## VII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

GFP	4	3	0	0	1	1	0	0	2	1	1	1	1	0	0	1	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6 a	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	> 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	14	45	41	42	31	38	20	33	16	14	24	32	38	44	52	21
	2	0	5	1	6	6	2	2	2	2	1	3	3	6	7	5	4
	3	2	4	3	2	5	1	1	0	3	0	1	4	2	0	0	1
	4	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	2	1	1	1	0	1
	5	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2	1	0
	6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	
8	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
10	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
12	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
13	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
14	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
18	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
25	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
26	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6 a	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	2	0	4	1	1	1	
10																	

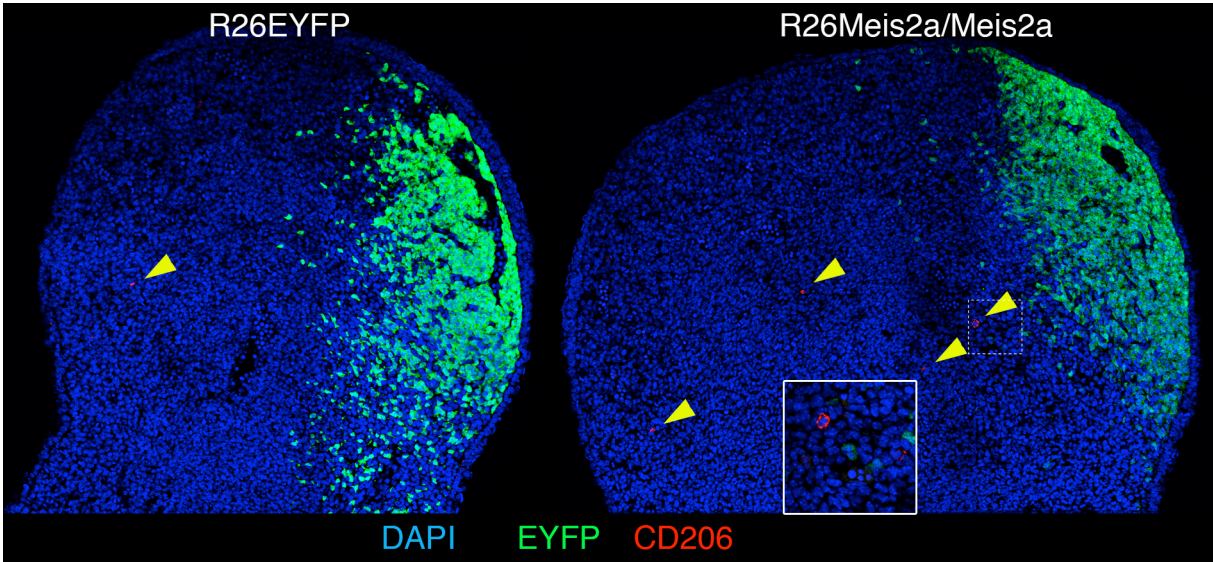
# VII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

		> 10	3	2	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	
Estilopodio	LacZ	1	96	207	210	255	334	293	287	261	338	324	370	242	317	261	280	223	
		2	12	21	10	13	25	25	10	10	20	6	9	10	23	8	21	2	
		3	3	5	3	2	3	2	2	1	5	1	0	3	3	2	2	0	
		4	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	
		5	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	
		6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		6 a 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		> 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GFP		1	68	201	58	105	115	98	247	188	141	225	96	82	284	241	203	121	
		2	11	10	2	11	7	6	11	6	8	8	6	12	18	8	25	6	
		3	0	0	0	3	1	0	1	0	0	1	1	1	2	2	3	0	
		4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		5	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

## VII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6 a 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
> 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

### VII.5.2 Expresión de otros marcadores de fagocitos.



**Figura S7.** La sobreexpresión de *Meis2* en el linaje de *Shh* provoca un aumento moderado del número de células fagocíticas. En los colores indicados aparece la expresión de EYFP (linaje de *Shh*) y de CD206 (receptor de manosa), que marca los fagocitos en general, profesionales y no profesionales. En la situación control (izquierda), se analizaron 17 secciones pertenecientes a 4 extremidades de E11.5 (2 superiores y 2 inferiores), encontrándose 2 células positivas para CD206 dentro del linaje de *Shh* (media por sección=0.12, sd=0.33), y 20 fuera de dicha región (media±sd=1.18±1.29, punta de flecha). En la situación experimental (derecha), se analizaron 14 secciones pertenecientes a 3 extremidades de E12 (2 superiores y una inferior), encontrándose 4 células positivas para CD206 dentro del linaje *Shh* (media±sd=0.29±0.47, valor p de prueba t no pareada=0.2529), y 60 fuera de dicha región (media±sd=4.29±3.02, p=0.0006). Fuera del linaje *Shh* se produce por tanto un aumento significativo del número de fagocitos. Las secciones mostradas son representativas. El detalle muestra ampliada la región punteada.

## VII.6 Discusión sobre los experimentos de trazado de linaje.

### VII.6.1 Elección de los genes cuyo linaje se iba a estudiar.

Considerando las características de todos los posibles marcadores que se han comentado en la Introducción, *Hoxa11* y *Hoxa13* eran los candidatos que posiblemente aportarían más información acerca de la dinámica del establecimiento del zeugopodio y autopodio. Los *Hoxd* de los mismos grupos parálogos habrían complicado demasiado el estudio, debido sobre todo a su compleja dinámica de expresión. Además, la expresión de *Hoxd13* en el autopodio no se extiende tanto como la de *Hoxa13*, por lo que algún territorio (mesopodio) podía haber acabado sin marcar si se hubiera elegido ese gen. Otra característica deseable era que a partir de algún estadio la expresión de los distintos marcadores no fuera solapante, y eso no se podía conseguir con los *Hoxd*. *Dach1* y *Dach2* podían haberse utilizado como genes de expresión restringida P-D, pero no cubren todo el eje A-P en algunos estadios (ver *Gene Expression Database* del MGI), limitando su utilidad.

En cuanto al marcador de estilopodio, además de los genes *Meis* existían otros candidatos, como por ejemplo *Shox2*. Sin embargo, pese a su expresión restringida en el eje P-D, su dominio temprano de expresión no cubre todo el eje A-P (Pennimpede *et al.*, 2010), por lo que no es tan útil como *Meis1* o *Meis2*. Se eligió *Meis1* en lugar de *Meis2* porque ya se había logrado modificar dicho *locus* con anterioridad en el laboratorio, pudiendo aprovecharse los brazos de homología ya clonados.

## VII.6.2 Funcionamiento de las líneas de ratón generadas.

El análisis de la expresión del gen *CreER<sup>T2</sup>* reveló que en la línea *Hoxa11<sup>CreERT2/+</sup>*, dicha expresión no recapitulaba la de *Hoxa11* en el mesénquima (Fig. R2 y S2). Aunque no se han incluido esos resultados en la tesis, la línea generada sí que marca los precursores musculares que migran a la extremidad, por lo que podría resultar útil para el trazado de dicha población. Respecto a las razones de esa desregulación, recuérdese que la estrategia de *targeting* que funcionó implicaba que ambos exones de *Hoxa11*, así como su intrón, eran eliminados. Los intentos anteriores de modificar este *locus* con una estrategia en la que sólo se eliminaba parte del primer exón habían resultado infructuosos. Se especuló que un posible motivo podía ser que ese *locus* sólo admitiera una cantidad limitada de material genético, y por eso se alteró la estrategia para eliminar aproximadamente la misma cantidad de material que se estaba introduciendo. A pesar de que de esta manera el *targeting* funcionó, vistos los resultados parece posible que el intrón eliminado contuviera una secuencia reguladora en *cis*, necesaria para la expresión de *Hoxa11* en el mesénquima de la extremidad. Dado que la regulación descrita de los genes *Hox* involucra en su mayor parte *enhancers* globales, no se esperaba que la eliminación del intrón tuviera un resultado tan drástico. En un futuro próximo se planea repetir el *targeting* pero eliminando sólo el exón 1, estrategia que recientemente se ha realizado en otro laboratorio exitosamente (Nelson *et al.*, 2008). Además, se van a realizar ensayos de transgénesis transitoria con la secuencia del intrón, para comprobar si es suficiente para dirigir la expresión mesenquimal de *Hoxa11*. Es destacable que el pez cebra tiene dos versiones de *hoxa11* (*a* y *b*), debido a la duplicación genómica de los teleósteos, y que mientras la versión *a* se expresa sólo en los precursores musculares, la forma *b* lo hace sólo en el mesénquima (Ahn y Ho, 2008). Sería interesante comprobar si estas dos versiones se diferencian en la secuencia de alguno de sus intrones.

Para *Hoxa13* también se utilizó la estrategia de eliminar sus exones e intrón, pero afortunadamente la expresión del transgén reproducía la del gen endógeno (Fig. R2). Por tanto, la posible secuencia reguladora local, de existir, sería un atributo específico del intrón de *Hoxa11*.

En cuanto a *Meis1*, la expresión de *CreER<sup>T2</sup>* reproducía a la perfección la del gen endógeno, aunque los niveles de expresión quizá no eran tan altos. Es destacable que dichos niveles de expresión mejoraron sensiblemente cuando se eliminó el transgén de resistencia a Neomicina (Fig. S1), sugiriendo que esta secuencia podría estar interfiriendo en la generación del transcrito. De hecho, se ha descrito que esta secuencia contiene sitios de *splicing* crípticos, de modo que cuando se inserta en un intrón (como es el caso), interfiere con la expresión del gen (Jacks *et al.*, 1994; Carmeliet *et al.*, 1996). Otra posible razón que pudo influir en la baja expresión observada era el hecho de que no se incluyó una secuencia de poliadenilación al final del gen *CreER<sup>T2</sup>*, para que utilizara la del *locus* en el que se estaba insertando, y así reprodujera lo más fielmente posible su expresión. No obstante, si por alguna razón el transcrito no lograba utilizar dicha

## VII. MATERIAL SUPLEMENTARIO

secuencia endógena, sería bastante inestable, lo que influiría negativamente en los niveles de expresión. Hasta el momento de escribir esta tesis, el trazado de linaje con esta línea sólo se pudo realizar con los individuos que todavía tenían el transgén de resistencia a Neomicina, y la frecuencia de marcaje obtenida no fue muy alta. Puesto que hasta donde se pudo comprobar, la CreER<sup>T2</sup> producida en el *locus* de *Meis1* funcionaba adecuadamente (Fig. R1, aunque hay que tener en cuenta que se trataba de una sobreexpresión en cultivo), la razón más probable para esa baja frecuencia *in vivo* era el escaso nivel de expresión comentado. En cualquier caso, la cantidad de marcaje fue suficiente para obtener algunas conclusiones.

### VII.7 Consideraciones sobre los experimentos de trasplantes.

#### VII.7.1 Modelo de trasplante de punta distal.

En anteriores trabajos ya se había utilizado el modelo de trasplante distal para evaluar diversos aspectos del desarrollo P-D (ver apartado I.2.5.5). En esta tesis se ha utilizado este modelo, pero con una ligera variante. Mientras en la mayoría de los anteriores estudios el corte se hacía perpendicular al eje P-D, en el presente trabajo el plano de corte se inclinó hacia la región posterior, para coger una población celular más homogénea en cuanto al destino P-D (Fig. R6). Una consecuencia adicional de esta variación era que probablemente implicaba que se estaba incluyendo parte de la ZPA en la punta distal, algo muy improbable en el caso del corte perpendicular, sobre todo si se cogía muy poco tejido. Esto resultaba ventajoso, porque la presencia de ZPA en el injerto favorecería un desarrollo normal, de modo que el resultado de los experimentos sería más sencillo de interpretar. Se podría argumentar que la presencia o ausencia de *Shh* en el injerto podría afectar a su especificación P-D, pero lo cierto es que no hay nada descrito al respecto. Además, el uso de un sistema de trasplante paralelo (los injertos obtenidos de un mismo donante se transplantaban a diferentes regiones), permitía hacer la comparación en igualdad de condiciones.

#### VII.7.2 Modelo de extremidades recombinantes (RLs).

Un aspecto importante de este modelo es la cantidad de manipulación que requiere. Pese a que en este trabajo y en otros se ha demostrado que los RLs esencialmente se comportan como extremidades normales (Fig. R17), también es cierto que el tratamiento con tripsina provoca, al menos a corto plazo, cierta sensibilización de las células de la extremidad a las señales proximales (Fig. S5). Teniendo en cuenta todos los datos, y que la tripsina es una proteasa que degrada gran parte de las proteínas del espacio intercelular, lo que probablemente está ocurriendo es que bien los receptores de FGF o los propios FGFs son degradados, lo que hace que la señalización FGF disminuya hasta que las células se recuperen. Esta disminución de señalización FGF sin duda permite que las células respondan a las señales proximales, activando *RARβ*. No obstante, este efecto no tiene consecuencias a largo plazo, presumiblemente porque las células vuelven a recibir señalización FGF enseguida, de modo que el simple tratamiento con tripsina no es suficiente para que las células puedan reprogramarse de manera permanente. Es necesario además alejarlas del AER, y por eso el uso de los recombinantes está justificado.

Ya se trasplantan a somitos (sRLs) o a zeugopodio (zRLs), la expresión génica en los RLs 8 horas tras la operación puede provocar confusión. El hecho de que *Meis1* se exprese tanto en sRLs como en zRLs seguramente indica que las células que se están utilizando todavía tienen



suficiente cantidad de RA en su interior como para activar esa vía de señalización si disminuye la de FGF. Por su parte, la disminución en la señalización FGF (confirmada por la reducida expresión de *Sprouty2*) es debida tanto a las horas que las células mesenquimales están desprovistas de ectodermo, como quizá al uso de tripsina (ver párrafo anterior). En cualquier caso, si los RLs no reciben un aporte continuo de RA, pierden la expresión de *Meis1* y *RAR $\beta$* , por lo que su expresión a 8 horas no es muy significativa ni tiene mayores consecuencias. Otro motivo por el que los datos a 8 horas deben tomarse con precaución es que las células todavía no están compactadas del todo, de modo que la técnica de hibridación *in situ* no funciona óptimamente, además de que el ectodermo no ha terminado de cerrarse sobre la herida, y los niveles de muerte en el mesénquima son muy altos (Marian Ros, comunicación personal). En cuanto al efecto de sustancias exógenas, 8 horas tras la operación los RLs tampoco parecían responder muy bien a RAA o FGF4, por lo que en definitiva la utilidad de los especímenes analizados en este punto temporal es bastante limitada.

Finalmente, es interesante comentar los resultados obtenidos con las extremidades recombinantes formadas con mesénquima de pata en lugar de ala. Pese a que se dispone de muy pocos especímenes, parece que no se comportan de manera equivalente a como lo hacen los RLs obtenidos con mesénquima de ala del mismo estadio. Es decir, al injertarlos en somitos, no parecen formar estilopodio (o al menos no forman tres segmentos), ni activan *Meis1* (Fig. S6). Teniendo en cuenta que al día siguiente de la operación los RLs de pata expresan *Cyp26b1* a lo largo de todo el eje, mientras que los de ala sólo en la parte distal, lo que probablemente está ocurriendo es que RA producido por los somitos es degradado en el RL y por eso no es capaz de reprogramar las células de este. Aunque esto podría interpretarse como una diferencia intrínseca entre ala y pata, es probable que sólo se deba a la heterocronía entre ambas extremidades (la pata está más avanzada que el ala, por lo que la expresión de *Cyp26b1* se consolida antes en la primera). Según esta última hipótesis, para obtener RLs con capacidad para ser reprogramados, probablemente habría que emplear donantes de estadios más tempranos (HH18).

## VII.8 Consideraciones sobre el experimento de *microarrays*.

El estadio usado para obtener material para este experimento se decidió considerando varios factores. La expresión de *Shh* comienza a E9.75, por lo que es de esperar que la proteína Cre se produzca unas pocas horas después. Cuando se acumule suficiente actividad Cre, se producirá la recombinación en el *locus* ROSA26, y un tiempo después la proteína MEIS2 empezará a acumularse. Finalmente, tras unas pocas horas, sus dianas transcripcionales se verán afectadas por su expresión. Esa cadena de retardos hace suponer que se requiere al menos un día desde la expresión del transcrito de *Shh* para detectar los cambios transcripcionales inducidos por MEIS2. E10.75 habría sido un buen estadio, por tanto, para detectar los cambios más directamente debidos a la presencia de MEIS2. Sin embargo, el factor práctico de la cantidad de tejido necesario para el experimento nos hizo considerar utilizar un estadio un poco más avanzado. Finalmente se decidió usar E11.5, el primer estadio en el que morfológicamente se puede apreciar alguna diferencia entre controles y experimentales.



## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**



- Abremski, K y Hoess, R.** 1985. Phage P1 Cre-loxP site-specific recombination. Effects of DNA supercoiling on catenation and knotting of recombinant products. *J Mol Biol* 184:211-220.
- Abu-Daya, A, Nishimoto, S, Fairclough, L, Mohun, TJ, Logan, MP y Zimmerman, LB.** 2010. The secreted integrin ligand nephronectin is necessary for forelimb formation in *Xenopus tropicalis*. *Dev Biol*.
- Agadir, A, Nau, H y Blaner, WS.** 1999. *Retinoids : the biochemical and molecular basis of Vitamin A and retinoid action*. Berlin ; New York: Springer. xxviii, 619 p. pp.
- Agarwal, P, Wylie, JN, Galceran, J, Arkhitko, O, Li, C, Deng, C, Grosschedl, R y Bruneau, BG.** 2003. Tbx5 is essential for forelimb bud initiation following patterning of the limb field in the mouse embryo. *Development* 130:623-633.
- Ahn, D y Ho, RK.** 2008. Tri-phasic expression of posterior Hox genes during development of pectoral fins in zebrafish: implications for the evolution of vertebrate paired appendages. *Dev Biol* 322:220-233.
- Ahn, DG, Kourakis, MJ, Rohde, LA, Silver, LM y Ho, RK.** 2002. T-box gene tbx5 is essential for formation of the pectoral limb bud. *Nature* 417:754-758.
- Ahn, K, Mishina, Y, Hanks, MC, Behringer, RR y Crenshaw, EB, 3rd.** 2001. BMPR-1A signaling is required for the formation of the apical ectodermal ridge and dorsal-ventral patterning of the limb. *Development* 128:4449-4461.
- Ahn, S y Joyner, AL.** 2004. Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning. *Cell* 118:505-516.
- Allen, SP, Maden, M y Price, JS.** 2002. A role for retinoic acid in regulating the regeneration of deer antlers. *Dev Biol* 251:409-423.
- Altabef, M y Tickle, C.** 2002. Initiation of dorso-ventral axis during chick limb development. *Mech Dev* 116:19-27.
- Ambler, CA, Nowicki, JL, Burke, AC y Bautch, VL.** 2001. Assembly of trunk and limb blood vessels involves extensive migration and vasculogenesis of somite-derived angioblasts. *Dev Biol* 234:352-364.
- Amprino, R y Camosso, M.** 1958. Experimental observations on influences exerted by the proximal over the distal territories of the extremities. *Experientia* 14:241-243.
- Amprino, R y Camosso, M.** 1959a. On the role of the "apical ridge" in the development of the chick embryo limb bud. *Acta Anat (Basel)* 38:280-288.
- Amprino, R y Camosso, M.** 1959b. [Observation on experimental duplication of the distal part of the primordium of the wing in chick embryo.]. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 48:261-305.
- Amprino, R y Camosso, ME.** 1965. [The regulation of excesses of the limb rudiment of the chicken]. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 54:781-809.
- Araujo, M, Piedra, ME, Herrera, MT, Ros, MA y Nieto, MA.** 1998. The expression and regulation of chick EphA7 suggests roles in limb patterning and innervation. *Development* 125:4195-4204.
- Armstrong, JL, Taylor, GA, Thomas, HD, Boddy, AV, Redfern, CP y Veal, GJ.** 2007. Molecular targeting of retinoic acid metabolism in neuroblastoma: the role of the CYP26 inhibitor R116010 in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 96:1675-1683.
- Arques, CG.** 2007. Análisis clonal en el embrión de ratón: compartimentos y relaciones de linaje en la extremidad en desarrollo. In: Departamento de Biología Molecular. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.
- Arques, CG, Doohan, R, Sharpe, J y Torres, M.** 2007. Cell tracing reveals a dorsoventral lineage restriction plane in the mouse limb bud mesenchyme. *Development* 134:3713-3722.
- Azcoitia, V, Aracil, M, Martinez, AC y Torres, M.** 2005. The homeodomain protein Meis1 is essential for definitive hematopoiesis and vascular patterning in the mouse embryo. *Dev Biol* 280:307-320.
- Bai, CB, Auerbach, W, Lee, JS, Stephen, D y Joyner, AL.** 2002. Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development* 129:4753-4761.
- Balmer, JE y Blomhoff, R.** 2005. A robust characterization of retinoic acid response elements based on a comparison of sites in three species. *J Steroid Biochem Mol Biol* 96:347-354.
- Barna, M, Pandolfi, PP y Niswander, L.** 2005. Gli3 and Plzf cooperate in proximal limb patterning at early stages of limb development. *Nature* 436:277-281.
- Barna, M y Niswander, L.** 2007. Visualization of cartilage formation: insight into cellular properties of skeletal progenitors and chondrodysplasia syndromes. *Dev Cell* 12:931-941.
- Barrow, JR, Thomas, KR, Boussadia-Zahui, O, Moore, R, Kemler, R, Capecchi, MR y McMahon, AP.** 2003. Ectodermal Wnt3/beta-catenin signaling is required for the establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge. *Genes Dev* 17:394-409.
- Basilico, C y Moscatelli, D.** 1992. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res* 59:115-165.
- Bastida, MF, Sheth, R y Ros, MA.** 2009. A BMP-Shh negative-feedback loop restricts Shh expression during limb development. *Development* 136:3779-3789.
- Bee, JA y von der Mark, K.** 1990. An analysis of chick limb bud intercellular adhesion underlying the establishment of cartilage aggregates in suspension culture. *J Cell Sci* 96 ( Pt 3):527-536.
- Benazet, JD, Bischofberger, M, Tiecke, E, Goncalves, A, Martin, JF, Zuniga, A, Naef, F y Zeller, R.** 2009. A self-regulatory system of interlinked signaling feedback loops controls mouse limb patterning. *Science* 323:1050-1053.
- Benazet, JD y Zeller, R.** 2009. Vertebrate limb development: moving from classical morphogen gradients to an integrated 4-dimensional patterning system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a001339.
- Berggren, K, McCaffery, P, Drager, U y Forehand, CJ.** 1999. Differential distribution of retinoic acid synthesis in the chicken embryo as determined by immunolocalization of the retinoic acid synthetic enzyme, RALDH-2. *Dev Biol* 210:288-304.
- Berggren, K, Ezerman, EB, McCaffery, P y Forehand, CJ.** 2001. Expression and regulation of the retinoic acid synthetic enzyme RALDH-2 in the embryonic chicken wing. *Dev Dyn* 222:1-16.
- Bertrand, S, Brunet, FG, Escriva, H, Parmentier, G, Laudet, V y Robinson-Rechavi, M.** 2004. Evolutionary genomics of nuclear receptors: from twenty-five ancestral genes to derived endocrine systems. *Mol Biol Evol* 21:1923-1937.



## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Boehm, B, Westerberg, H, Lesnicar-Pucko, G, Raja, S, Rautschka, M, Cotterell, J, Swoger, J y Sharpe, J. 2010. The role of spatially controlled cell proliferation in limb bud morphogenesis. *PLoS Biol* 8:e1000420.
- Boulet, AM y Capecci, MR. 2004. Multiple roles of Hoxa11 and Hoxd11 in the formation of the mammalian forelimb zeugopod. *Development* 131:299-309.
- Boulet, AM, Moon, AM, Arenkiel, BR y Capecci, MR. 2004. The roles of Fgf4 and Fgf8 in limb bud initiation and outgrowth. *Dev Biol* 273:361-372.
- Bowen, J, Hinchliffe, JR, Horder, TJ y Reeve, AM. 1989. The fate map of the chick forelimb-bud and its bearing on hypothesized developmental control mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 179:269-283.
- Brand-Saberi, B, Seifert, R, Grim, M, Wilting, J, Kuhlewein, M y Christ, B. 1995. Blood vessel formation in the avian limb bud involves angioblastic and angiotrophic growth. *Dev Dyn* 202:181-194.
- Branda, CS y Dymecki, SM. 2004. Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell* 6:7-28.
- Bruno, RD y Njar, VC. 2007. Targeting cytochrome P450 enzymes: a new approach in anti-cancer drug development. *Bioorg Med Chem* 15:5047-5060.
- Budhu, AS y Noy, N. 2002. Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. *Mol Cell Biol* 22:2632-2641.
- Canestro, C, Postlethwait, JH, Gonzalez-Duarte, R y Albalat, R. 2006. Is retinoic acid genetic machinery a chordate innovation? *Evol Dev* 8:394-406.
- Capdevila, J, Tsukui, T, Rodriguez Esteban, C, Zappavigna, V y Izpisua Belmonte, JC. 1999. Control of vertebrate limb outgrowth by the proximal factor Meis2 and distal antagonism of BMPs by Gremlin. *Mol Cell* 4:839-849.
- Capdevila, J y Izpisua Belmonte, JC. 2001. Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:87-132.
- Capehart, AA. 2010. Proteolytic cleavage of versican during limb joint development. *Anat Rec (Hoboken)* 293:208-214.
- Capellini, TD, Di Giacomo, G, Salsi, V, Brendolan, A, Ferretti, E, Srivastava, D, Zappavigna, V y Selleri, L. 2006. Pbx1/Pbx2 requirement for distal limb patterning is mediated by the hierarchical control of Hox gene spatial distribution and Shh expression. *Development* 133:2263-2273.
- Carmeliet, P, Ferreira, V, Breier, G, Pollefeyt, S, Kieckens, L, Gertsenstein, M, Fahrig, M, Vandenhoek, A, Harpal, K, Eberhardt, C, Declercq, C, Pawling, J, Moons, L, Collen, D, Risau, W y Nagy, A. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380:435-439.
- Casares, F y Mann, RS. 2000. A dual role for homothorax in inhibiting wing blade development and specifying proximal wing identities in *Drosophila*. *Development* 127:1499-1508.
- Chambers, D, Wilson, L, Maden, M y Lumsden, A. 2007. RALDH-independent generation of retinoic acid during vertebrate embryogenesis by CYP1B1. *Development* 134:1369-1383.
- Chambon, P. 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 10:940-954.
- Chan, A, Dong, M, Wang, L y Chan, W. 2005. Somite as a Morphological Reference for Staging and Axial Levels of Developing Structures in Mouse Embryos. *Neuroembryology and Aging* 3:9.
- Chapman, DL, Garvey, N, Hancock, S, Alexiou, M, Agulnik, SI, Gibson-Brown, JJ, Cebra-Thomas, J, Bollag, RJ, Silver, LM y Papaioannou, VE. 1996. Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. *Dev Dyn* 206:379-390.
- Chapman, SC, Lawson, A, Macarthur, WC, Wiese, RJ, Loechel, RH, Burgos-Trinidad, M, Wakefield, JK, Ramabhadran, R, Mauch, TJ y Schoenwolf, GC. 2005. Ubiquitous GFP expression in transgenic chickens using a lentiviral vector. *Development* 132:935-940.
- Charite, J, McFadden, DG y Olson, EN. 2000. The bHLH transcription factor dHAND controls Sonic hedgehog expression and establishment of the zone of polarizing activity during limb development. *Development* 127:2461-2470.
- Chen, H, Namkung, MJ y Juchau, MR. 1995. Biotransformation of all-trans-retinol and all-trans-retinal to all-trans-retinoic acid in rat conceptal homogenates. *Biochem Pharmacol* 50:1257-1264.
- Chen, H, Lun, Y, Ovchinnikov, D, Kokubo, H, Oberg, KC, Pepicelli, CV, Gan, L, Lee, B y Johnson, RL. 1998. Limb and kidney defects in Lmx1b mutant mice suggest an involvement of LMX1B in human nail patella syndrome. *Nat Genet* 19:51-55.
- Chen, L y Deng, CX. 2005. Roles of FGF signaling in skeletal development and human genetic diseases. *Front Biosci* 10:1961-1976.
- Chevallier, A, Kieny, M y Mauger, A. 1977. Limb-somite relationship: origin of the limb musculature. *J Embryol Exp Morphol* 41:245-258.
- Chiang, C, Litngtung, Y, Lee, E, Young, KE, Corden, JL, Westphal, H y Beachy, PA. 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383:407-413.
- Chiang, C, Litngtung, Y, Harris, MP, Simandl, BK, Li, Y, Beachy, PA y Fallon, JF. 2001. Manifestation of the limb prepattern: limb development in the absence of sonic hedgehog function. *Dev Biol* 236:421-435.
- Choe, SK, Lu, P, Nakamura, M, Lee, J y Sagerstrom, CG. 2009. Meis cofactors control HDAC and CBP accessibility at Hox-regulated promoters during zebrafish embryogenesis. *Dev Cell* 17:561-567.
- Christ, B, Jacob, HJ y Jacob, M. 1977. Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos. *Anat Embryol (Berl)* 150:171-186.
- Cohn, MJ, Izpisua-Belmonte, JC, Abud, H, Heath, JK y Tickle, C. 1995. Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell* 80:739-746.
- Cohn, MJ, Patel, K, Krumlauf, R, Wilkinson, DG, Clarke, JD y Tickle, C. 1997. Hox9 genes and vertebrate limb specification. *Nature* 387:97-101.
- Copeland, NG, Jenkins, NA y Court, DL. 2001. Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet* 2:769-779.

- Costaridis, P, Horton, C, Zeitlinger, J, Holder, N y Maden, M. 1996. Endogenous retinoids in the zebrafish embryo and adult. *Dev Dyn* 205:41-51.
- Couso, JP y Bishop, SA. 1998. Proximo-distal development in the legs of *Drosophila*. *Int J Dev Biol* 42:345-352.
- Crawford, K y Stocum, DL. 1988a. Retinoic acid coordinately proximalizes regenerate pattern and blastema differential affinity in axolotl limbs. *Development* 102:687-698.
- Crawford, K y Stocum, DL. 1988b. Retinoic acid proximalizes level-specific properties responsible for intercalary regeneration in axolotl limbs. *Development* 104:703-712.
- Crocoll, A, Herzer, U, Ghyselinck, NB, Chambon, P y Cato, AC. 2002. Interdigital apoptosis and downregulation of BAG-1 expression in mouse autopods. *Mech Dev* 111:149-152.
- Crosby, GM y Fallon, JF. 1975. Inhibitory effect on limb morphogenesis by cells of the polarizing zone coaggregated with pre- or postaxial wing bud mesoderm. *Dev Biol* 46:28-39.
- Crossley, PH, Minowada, G, MacArthur, CA y Martin, GR. 1996. Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell* 84:127-136.
- Cygan, JA, Johnson, RL y McMahon, AP. 1997. Novel regulatory interactions revealed by studies of murine limb pattern in Wnt-7a and En-1 mutants. *Development* 124:5021-5032.
- da Silva, SM, Gates, PB y Brockes, JP. 2002. The newt ortholog of CD59 is implicated in proximodistal identity during amphibian limb regeneration. *Dev Cell* 3:547-555.
- Dahn, RD y Fallon, JF. 2000. Interdigital regulation of digit identity and homeotic transformation by modulated BMP signaling. *Science* 289:438-441.
- Davis, AP y Capecchi, MR. 1994. Axial homeosis and appendicular skeleton defects in mice with a targeted disruption of *hoxd-11*. *Development* 120:2187-2198.
- Davis, AP, Witte, DP, Hsieh-Li, HM, Potter, SS y Capecchi, MR. 1995. Absence of radius and ulna in mice lacking *hoxa-11* and *hoxd-11*. *Nature* 375:791-795.
- Davis, RJ, Pesah, YI, Harding, M, Paylor, R y Mardon, G. 2006. Mouse *Dach2* mutants do not exhibit gross defects in eye development or brain function. *Genesis* 44:84-92.
- Dealy, CN, Roth, A, Ferrari, D, Brown, AM y Kosher, RA. 1993. Wnt-5a and Wnt-7a are expressed in the developing chick limb bud in a manner suggesting roles in pattern formation along the proximodistal and dorsoventral axes. *Mech Dev* 43:175-186.
- Dmetrichuk, JM, Carlone, RL, Jones, TR, Vesprini, ND y Spencer, GE. 2008. Detection of endogenous retinoids in the molluscan CNS and characterization of the trophic and tropic actions of 9-cis retinoic acid on isolated neurons. *J Neurosci* 28:13014-13024.
- Dolle, P, Izpisua-Belmonte, JC, Falkenstein, H, Renucci, A y Duboule, D. 1989a. Coordinate expression of the murine Hox-5 complex homoeobox-containing genes during limb pattern formation. *Nature* 342:767-772.
- Dolle, P, Ruberte, E, Kastner, P, Petkovich, M, Stoner, CM, Gudas, LJ y Chambon, P. 1989b. Differential expression of genes encoding alpha, beta and gamma retinoic acid receptors and CRABP in the developing limbs of the mouse. *Nature* 342:702-705.
- Dolle, P, Ruberte, E, Leroy, P, Morriss-Kay, G y Chambon, P. 1990. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. *Development* 110:1133-1151.
- Dolle, P. 2009. Developmental expression of retinoic acid receptors (RARs). *Nucl Recept Signal* 7:e006.
- Dottori, M, Hartley, L, Galea, M, Paxinos, G, Polizzotto, M, Kilpatrick, T, Bartlett, PF, Murphy, M, Kontgen, F y Boyd, AW. 1998. EphA4 (Sek1) receptor tyrosine kinase is required for the development of the corticospinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13248-13253.
- Driesch, H. 1892. *The potency of the first two cleavage cells in echinoderm development. Experimental production of partial and double formation*. New Jersey: Prentice Hall.
- Dudley, AT, Ros, MA y Tabin, CJ. 2002. A re-examination of proximodistal patterning during vertebrate limb development. *Nature* 418:539-544.
- Duester, G, Mic, FA y Molotkov, A. 2003. Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol Interact* 143-144:201-210.
- Duester, G. 2008. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 134:921-931.
- Dupe, V, Ghyselinck, NB, Thomazy, V, Nagy, L, Davies, PJ, Chambon, P y Mark, M. 1999. Essential roles of retinoic acid signaling in interdigital apoptosis and control of BMP-7 expression in mouse autopods. *Dev Biol* 208:30-43.
- Eblaghie, MC, Lunn, JS, Dickinson, RJ, Munsterberg, AE, Sanz-Ezquerro, JJ, Farrell, ER, Mathers, J, Keyse, SM, Storey, K y Tickle, C. 2003. Negative feedback regulation of FGF signaling levels by Pyst1/MKP3 in chick embryos. *Curr Biol* 13:1009-1018.
- Echeverri, K y Tanaka, EM. 2005. Proximodistal patterning during limb regeneration. *Dev Biol* 279:391-401.
- Eisenhauer, PB, Harwig, SS y Lehrer, RI. 1992. Cryptidins: antimicrobial defensins of the murine small intestine. *Infect Immun* 60:3556-3565.
- Eisenhauer, PB y Lehrer, RI. 1992. Mouse neutrophils lack defensins. *Infect Immun* 60:3446-3447.
- Elisa Piedra, M, Borja Rivero, F, Fernandez-Teran, M y Ros, MA. 2000. Pattern formation and regulation of gene expressions in chick recombinant limbs. *Mech Dev* 90:167-179.
- Esworthy, RS, Smith, DD y Chu, FF. 2010. A Strong Impact of Genetic Background on Gut Microflora in Mice. *Int J Inflam* 2010:986046.
- Fallon, JF, Lopez, A, Ros, MA, Savage, MP, Olwin, BB y Simandl, BK. 1994. FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science* 264:104-107.
- Fawcett, D, Pasceri, P, Fraser, R, Colbert, M, Rossant, J y Giguere, V. 1995. Postaxial polydactyly in forelimbs of CRABP-II mutant mice. *Development* 121:671-679.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Fernandes-Alnemri, T, Litwack, G y Alnemri, ES. 1994. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem* 269:30761-30764.
- Fernandez-Teran, M, Piedra, ME, Simandl, BK, Fallon, JF y Ros, MA. 1997. Limb initiation and development is normal in the absence of the mesonephros. *Dev Biol* 189:246-255.
- Fernandez-Teran, M, Piedra, ME, Ros, MA y Fallon, JF. 1999. The recombinant limb as a model for the study of limb patterning, and its application to muscle development. *Cell Tissue Res* 296:121-129.
- Fernandez-Teran, M y Ros, MA. 2008. The Apical Ectodermal Ridge: morphological aspects and signaling pathways. *Int J Dev Biol* 52:857-871.
- Fernandez-Teran, MA, Hinchliffe, JR y Ros, MA. 2006. Birth and death of cells in limb development: a mapping study. *Dev Dyn* 235:2521-2537.
- Flenniken, AM, Gale, NW, Yancopoulos, GD y Wilkinson, DG. 1996. Distinct and overlapping expression patterns of ligands for Eph-related receptor tyrosine kinases during mouse embryogenesis. *Dev Biol* 179:382-401.
- Fowles, LF, Bennetts, JS, Berkman, JL, Williams, E, Koopman, P, Teasdale, RD y Wicking, C. 2003. Genomic screen for genes involved in mammalian craniofacial development. *Genesis* 35:73-87.
- Freitas, R, Zhang, G y Cohn, MJ. 2006. Evidence that mechanisms of fin development evolved in the midline of early vertebrates. *Nature* 442:1033-1037.
- Fromental-Ramain, C, Warot, X, Lakkaraju, S, Favier, B, Haack, H, Birling, C, Dierich, A, Doll e, P y Chambon, P. 1996a. Specific and redundant functions of the paralogous Hoxa-9 and Hoxd-9 genes in forelimb and axial skeleton patterning. *Development* 122:461-472.
- Fromental-Ramain, C, Warot, X, Messadecq, N, LeMeur, M, Dolle, P y Chambon, P. 1996b. Hoxa-13 and Hoxd-13 play a crucial role in the patterning of the limb autopod. *Development* 122:2997-3011.
- Fry, JD y Saweikis, M. 2006. Aldehyde dehydrogenase is essential for both adult and larval ethanol resistance in Drosophila melanogaster. *Genet Res* 87:87-92.
- Fujii, H, Sato, T, Kaneko, S, Gotoh, O, Fujii-Kuriyama, Y, Osawa, K, Kato, S y Hamada, H. 1997. Metabolic inactivation of retinoic acid by a novel P450 differentially expressed in developing mouse embryos. *EMBO J* 16:4163-4173.
- Fujita, A y Mitsuhashi, T. 1999. Differential regulation of ligand-dependent and ligand-independent functions of the mouse retinoid X receptor beta by alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 255:625-630.
- Fujiwara, S y Kawamura, K. 2003. Acquisition of retinoic acid signaling pathway and innovation of the chordate body plan. *Zoolog Sci* 20:809-818.
- Galli, A, Robay, D, Osterwalder, M, Bao, X, Benazet, JD, Tariq, M, Paro, R, Mackem, S y Zeller, R. 2010. Distinct roles of Hand2 in initiating polarity and posterior Shh expression during the onset of mouse limb bud development. *PLoS Genet* 6:e1000901.
- Galloway, JL, Delgado, I, Ros, MA y Tabin, CJ. 2009. A reevaluation of X-irradiation-induced phocomelia and proximodistal limb patterning. *Nature* 460:400-404.
- Garcia-Bellido, A. 1966. Pattern reconstruction by dissociated imaginal disk cells of Drosophila melanogaster. *Dev Biol* 14:278-306.
- Garrity, DM, Childs, S y Fishman, MC. 2002. The heartstrings mutation in zebrafish causes heart/fin Tbx5 deficiency syndrome. *Development* 129:4635-4645.
- Garza-Garcia, A, Harris, R, Esposito, D, Gates, PB y Driscoll, PC. 2009. Solution structure and phylogenetics of Prod1, a member of the three-finger protein superfamily implicated in salamander limb regeneration. *PLoS One* 4:e7123.
- Gavrieli, Y, Sherman, Y y Ben-Sasson, SA. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493-501.
- Geduspan, JS y MacCabe, JA. 1986. Evidence for the transmission of dorsoventral information to the ectoderm during the earliest stages of limb development. *Prog Clin Biol Res* 226:115-126.
- Geduspan, JS y MacCabe, JA. 1989. Transfer of dorsoventral information from mesoderm to ectoderm at the onset of limb development. *Anat Rec* 224:79-87.
- Geduspan, JS y Solursh, M. 1992. A growth-promoting influence from the mesonephros during limb outgrowth. *Dev Biol* 151:242-250.
- Gehring, WJ y Hiromi, Y. 1986. Homeotic genes and the homeobox. *Annu Rev Genet* 20:147-173.
- Geissmann, F, Revy, P, Brousse, N, Lepelletier, Y, Folli, C, Durandy, A, Chambon, P y Dy, M. 2003. Retinoids regulate survival and antigen presentation by immature dendritic cells. *J Exp Med* 198:623-634.
- Germain, P, Iyer, J, Zechel, C y Gronemeyer, H. 2002. Co-regulator recruitment and the mechanism of retinoic acid receptor synergy. *Nature* 415:187-192.
- Geurts, AM, Cost, GJ, Freyvert, Y, Zeitler, B, Miller, JC, Choi, VM, Jenkins, SS, Wood, A, Cui, X, Meng, X, Vincent, A, Lam, S, Michalkiewicz, M, Schilling, R, Foeckler, J, Kalloway, S, Weiler, H, Menoret, S, Anegon, I, Davis, GD, Zhang, L, Rebar, EJ, Gregory, PD, Urnov, FD, Jacob, HJ y Buelow, R. 2009. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* 325:433.
- Geurts, AM, Cost, GJ, Remy, S, Cui, X, Tesson, L, Usal, C, Menoret, S, Jacob, HJ, Anegon, I y Buelow, R. 2010. Generation of gene-specific mutated rats using zinc-finger nucleases. *Methods Mol Biol* 597:211-225.
- Geurts, AM y Moreno, C. 2010. Zinc-finger nucleases: new strategies to target the rat genome. *Clin Sci (Lond)* 119:303-311.
- Ghyselinck, NB, Dupe, V, Dierich, A, Messadecq, N, Garnier, JM, Rochette-Egly, C, Chambon, P y Mark, M. 1997. Role of the retinoic acid receptor beta (RARbeta) during mouse development. *Int J Dev Biol* 41:425-447.
- Gibert, Y, Gajewski, A, Meyer, A y Begemann, G. 2006. Induction and pre patterning of the zebrafish pectoral fin bud requires axial retinoic acid signaling. *Development* 133:2649-2659.
- Gibson-Brown, JJ, Agulnik, SI, Chapman, DL, Alexiou, M, Garvey, N, Silver, LM y Papaioannou, VE. 1996. Evidence of a role for T-box genes in the evolution of limb morphogenesis and the specification of forelimb/hindlimb identity. *Mech Dev* 56:93-101.



- Giguere, V, Lyn, S, Yip, P, Siu, CH y Amin, S. 1990. Molecular cloning of cDNA encoding a second cellular retinoic acid-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6233-6237.
- Goff, DJ y Tabin, CJ. 1997. Analysis of Hoxd-13 and Hoxd-11 misexpression in chick limb buds reveals that Hox genes affect both bone condensation and growth. *Development* 124:627-636.
- Gonzalez-Crespo, S, Abu-Shaar, M, Torres, M, Martinez, AC, Mann, RS y Morata, G. 1998. Antagonism between extradenticle function and Hedgehog signalling in the developing limb. *Nature* 394:196-200.
- Gorry, P, Lufkin, T, Dierich, A, Rochette-Egly, C, Decimo, D, Dolle, P, Mark, M, Durand, B y Chambon, P. 1994. The cellular retinoic acid binding protein I is dispensable. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9032-9036.
- Grigoryan, T, Wend, P, Klaus, A y Birchmeier, W. 2008. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes Dev* 22:2308-2341.
- Haack, H y Gruss, P. 1993. The establishment of murine Hox-1 expression domains during patterning of the limb. *Dev Biol* 157:410-422.
- Hall, BK. 2007. *Fins into limbs : evolution, development, and transformation*. Chicago: University of Chicago Press. 433 p., 420 p. of plates pp.
- Halme, A, Cheng, M y Hariharan, IK. 2010. Retinoids regulate a developmental checkpoint for tissue regeneration in *Drosophila*. *Curr Biol* 20:458-463.
- Hamburger, VaH, H.L. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*:49-92.
- Hampe, A. 1959. [Contribution to the study of the development and the regulation of deficiencies and excesses in the feet of chick embryos.]. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 48:345-478.
- Harfe, BD, Scherz, PJ, Nissim, S, Tian, H, McMahon, AP y Tabin, CJ. 2004. Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell* 118:517-528.
- Hashimoto, K, Yokouchi, Y, Yamamoto, M y Kuroiwa, A. 1999. Distinct signaling molecules control Hoxa-11 and Hoxa-13 expression in the muscle precursor and mesenchyme of the chick limb bud. *Development* 126:2771-2783.
- Hayamizu, TF y Bryant, SV. 1994. Reciprocal changes in Hox D13 and RAR-beta 2 expression in response to retinoic acid in chick limb buds. *Dev Biol* 166:123-132.
- Helms, JA, Kim, CH, Eichele, G y Thaller, C. 1996. Retinoic acid signaling is required during early chick limb development. *Development* 122:1385-1394.
- Hernandez-Martinez, R, Castro-Obregon, S y Covarrubias, L. 2009. Progressive interdigital cell death: regulation by the antagonistic interaction between fibroblast growth factor 8 and retinoic acid. *Development* 136:3669-3678.
- Hill, P, Gotz, K y Ruther, U. 2009. A SHH-independent regulation of Gli3 is a significant determinant of anteroposterior patterning of the limb bud. *Dev Biol* 328:506-516.
- Hill, TP, Taketo, MM, Birchmeier, W y Hartmann, C. 2006. Multiple roles of mesenchymal beta-catenin during murine limb patterning. *Development* 133:1219-1229.
- Hisa, T, Spence, SE, Rachel, RA, Fujita, M, Nakamura, T, Ward, JM, Devor-Henneman, DE, Saiki, Y, Kutsuna, H, Tassarollo, L, Jenkins, NA y Copeland, NG. 2004. Hematopoietic, angiogenic and eye defects in Meis1 mutant animals. *EMBO J* 23:450-459.
- Hoess, RH y Abremski, K. 1985. Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system. *J Mol Biol* 181:351-362.
- Holder, N y Klein, R. 1999. Eph receptors and ephrins: effectors of morphogenesis. *Development* 126:2033-2044.
- Hollyday, M. 1983. Development of motor innervation of chick limbs. *Prog Clin Biol Res* 110 Pt A:183-193.
- Honig, LS. 1981. Positional signal transmission in the developing chick limb. *Nature* 291:72-73.
- Hornbruch, A y Wolpert, L. 1970. Cell division in the early growth and morphogenesis of the chick limb. *Nature* 226:764-766.
- Horton, C y Maden, M. 1995. Endogenous distribution of retinoids during normal development and teratogenesis in the mouse embryo. *Dev Dyn* 202:312-323.
- Huang, XZ, Wu, JF, Ferrando, R, Lee, JH, Wang, YL, Farese, RV, Jr. y Sheppard, D. 2000. Fatal bilateral chylothorax in mice lacking the integrin alpha9beta1. *Mol Cell Biol* 20:5208-5215.
- Hudson, KS, Andrews, K, Early, J, Mjaatvedt, CH y Capehart, AA. 2010. Versican G1 Domain and V3 Isoform Overexpression Results in Increased Chondrogenesis in the Developing Chick Limb In Ovo. *Anat Rec (Hoboken)*.
- Hui, CC y Joyner, AL. 1993. A mouse model of greig cephalopolysyndactyly syndrome: the extra-toes mutation contains an intragenic deletion of the Gli3 gene. *Nat Genet* 3:241-246.
- Ide, H, Wada, N y Uchiyama, K. 1994. Sorting out of cells from different parts and stages of the chick limb bud. *Dev Biol* 162:71-76.
- Indra, AK, Warot, X, Brocard, J, Bornert, JM, Xiao, JH, Chambon, P y Metzger, D. 1999. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res* 27:4324-4327.
- Iten, LE y Murphy, DJ. 1980. Pattern regulation in the embryonic chick limb: supernumerary limb formation with anterior (non-ZPA) limb bud tissue. *Dev Biol* 75:373-385.
- Itoh, N y Ornitz, DM. 2004. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet* 20:563-569.
- Izpisua-Belmonte, JC, Tickle, C, Dolle, P, Wolpert, L y Duboule, D. 1991. Expression of the homeobox Hox-4 genes and the specification of position in chick wing development. *Nature* 350:585-589.
- Jacks, T, Shih, TS, Schmitt, EM, Bronson, RT, Bernards, A y Weinberg, RA. 1994. Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in Nf1. *Nat Genet* 7:353-361.
- Janners, MY y Searls, RL. 1971. Effect of removal of the apical ectodermal ridge on the rate of cell division in the subridge mesenchyme of the embryonic chick wing. *Dev Biol* 24:465-476.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Jones, FS, Prediger, EA, Bittner, DA, De Robertis, EM y Edelman, GM. 1992. Cell adhesion molecules as targets for Hox genes: neural cell adhesion molecule promoter activity is modulated by cotransfection with Hox-2.5 and -2.4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2086-2090.
- Kawakami, Y, Capdevila, J, Buscher, D, Itoh, T, Rodriguez Esteban, C y Izpisua Belmonte, JC. 2001. WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell* 104:891-900.
- Kawakami, Y, Rodriguez-Leon, J, Koth, CM, Buscher, D, Itoh, T, Raya, A, Ng, JK, Esteban, CR, Takahashi, S, Henrique, D, Schwarz, MF, Asahara, H y Izpisua Belmonte, JC. 2003. MKP3 mediates the cellular response to FGF8 signalling in the vertebrate limb. *Nat Cell Biol* 5:513-519.
- Kawakami, Y, Esteban, CR, Matsui, T, Rodriguez-Leon, J, Kato, S y Izpisua Belmonte, JC. 2004. Sp8 and Sp9, two closely related buttonhead-like transcription factors, regulate Fgf8 expression and limb outgrowth in vertebrate embryos. *Development* 131:4763-4774.
- Kawakami, Y, Rodriguez-Leon, J y Izpisua Belmonte, JC. 2006. The role of TGFbetas and Sox9 during limb chondrogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 18:723-729.
- Kawakami, Y, Uchiyama, Y, Rodriguez Esteban, C, Inenaga, T, Koyano-Nakagawa, N, Kawakami, H, Marti, M, Kmita, M, Monaghan-Nichols, P, Nishinakamura, R y Izpisua Belmonte, JC. 2009. Sall genes regulate region-specific morphogenesis in the mouse limb by modulating Hox activities. *Development* 136:585-594.
- Kengaku, M, Twombly, V y Tabin, C. 1997. Expression of Wnt and Frizzled genes during chick limb bud development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62:421-429.
- Kengaku, M, Capdevila, J, Rodriguez-Esteban, C, De La Pena, J, Johnson, RL, Izpisua Belmonte, JC y Tabin, CJ. 1998. Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud. *Science* 280:1274-1277.
- Khokha, MK, Hsu, D, Brunet, LJ, Dionne, MS y Harland, RM. 2003. Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of Shh and Fgf signals during limb patterning. *Nat Genet* 34:303-307.
- Kida, Y, Maeda, Y, Shiraishi, T, Suzuki, T y Ogura, T. 2004. Chick Dach1 interacts with the Smad complex and Sin3a to control AER formation and limb development along the proximodistal axis. *Development* 131:4179-4187.
- Kieny, M. 1964a. [Regulation of Excesses and Deficiencies of the Wing Rudiment of the Chick Embryo.]. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 53:29-44.
- Kieny, M. 1964b. [Study of the Mechanism of Regulation of Development of Limb Rudiments in the Chick Embryo. II. Regulation of Deficiencies in "Wing-Leg" and "Leg-Wing" Chimeras.]. *J Embryol Exp Morphol* 12:357-371.
- Kieny, M. 1964c. [Study of the Mechanism of Regulation in the Development of the Limb Buds of the Chick Embryo. I. Regulation of the Excess.]. *Dev Biol* 22:197-229.
- Kieny, M y Dhouailly, D. 1969. [Mechanisms of induction of a supplementary member in birds]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 269:481-483.
- Kieny, M. 1970. [Part of somitic mesoderm in the differentiation of chick embryo limb]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 270:2009-2011.
- Kimura, Y, Matsunami, H, Inoue, T, Shimamura, K, Uchida, N, Ueno, T, Miyazaki, T y Takeichi, M. 1995. Cadherin-11 expressed in association with mesenchymal morphogenesis in the head, somite, and limb bud of early mouse embryos. *Dev Biol* 169:347-358.
- Kitamoto, T, Momoi, T y Momoi, M. 1988. The presence of a novel cellular retinoic acid-binding protein in chick embryos: purification and partial characterization. *Biochem Biophys Res Commun* 157:1302-1308.
- Klein, ES, Pino, ME, Johnson, AT, Davies, PJ, Nagpal, S, Thacher, SM, Krasinski, G y Chandraratna, RA. 1996. Identification and functional separation of retinoic acid receptor neutral antagonists and inverse agonists. *J Biol Chem* 271:22692-22696.
- Kmita, M, Tarchini, B, Zakany, J, Logan, M, Tabin, CJ y Duboule, D. 2005. Early developmental arrest of mammalian limbs lacking HoxA/HoxD gene function. *Nature* 435:1113-1116.
- Koo, BC, Kwon, MS, Choi, BR, Kim, JH, Cho, SK, Sohn, SH, Cho, EJ, Lee, HT, Chang, W, Jeon, I, Park, JK, Park, JB y Kim, T. 2006. Production of germline transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein using a MoMLV-based retrovirus vector. *FASEB J* 20:2251-2260.
- Kostakopoulou, K, Vogel, A, Brickell, P y Tickle, C. 1996. 'Regeneration' of wing bud stumps of chick embryos and reactivation of Msx-1 and Shh expression in response to FGF-4 and ridge signals. *Mech Dev* 55:119-131.
- Kostakopoulou, K, Vargesson, N, Clarke, JD, Brickell, PM y Tickle, C. 1997. Local origin of cells in FGF-4 - induced outgrowth of amputated chick wing bud stumps. *Int J Dev Biol* 41:747-750.
- Koyama, E, Yasuda, T, Minugh-Purvis, N, Kinumatsu, T, Yallowitz, AR, Wellik, DM y Pacifici, M. 2010. Hox11 genes establish synovial joint organization and phylogenetic characteristics in developing mouse zeugopod skeletal elements. *Development* 137:3795-3800.
- Krabbenhoft, KM y Fallon, JF. 1989. The formation of leg or wing specific structures by leg bud cells grafted to the wing bud is influenced by proximity to the apical ridge. *Dev Biol* 131:373-382.
- Kraft, JC, Schuh, T, Juchau, M y Kimelman, D. 1994. The retinoid X receptor ligand, 9-cis-retinoic acid, is a potential regulator of early Xenopus development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3067-3071.
- Kraus, P, Fraidenraich, D y Loomis, CA. 2001. Some distal limb structures develop in mice lacking Sonic hedgehog signaling. *Mech Dev* 100:45-58.
- Krawchuk, D, Weiner, SJ, Chen, YT, Lu, B, Costantini, F, Behringer, RR y Laufer, E. 2010. Twist1 activity thresholds define multiple functions in limb development. *Dev Biol*.
- Kuhlman, J y Niswander, L. 1997. Limb deformity proteins: role in mesodermal induction of the apical ectodermal ridge. *Development* 124:133-139.
- Kuss, P, Villavicencio-Lorini, P, Witte, F, Klose, J, Albrecht, AN, Seemann, P, Hecht, J y Mundlos, S. 2009. Mutant Hoxd13 induces extra digits in a mouse model of synpolydactyly directly and by decreasing retinoic acid synthesis. *J Clin Invest* 119:146-156.



- Lampron, C, Rochette-Egly, C, Gorry, P, Dolle, P, Mark, M, Lufkin, T, LeMeur, M y Chambon, P. 1995. Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal. *Development* 121:539-548.
- Lancot, C, Moreau, A, Chamberland, M, Tremblay, ML y Drouin, J. 1999. Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene. *Development* 126:1805-1810.
- Lane, ME, Runko, AP, Roy, NM y Sagerstrom, CG. 2002. Dynamic expression and regulation by Fgf8 and Pou2 of the zebrafish LIM-only gene, lmo4. *Mech Dev* 119 Suppl 1:S185-189.
- Laufer, E, Nelson, CE, Johnson, RL, Morgan, BA y Tabin, C. 1994. Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell* 79:993-1003.
- Lawrence, PA y Levine, M. 2006. Mosaic and regulative development: two faces of one coin. *Curr Biol* 16:R236-239.
- Lee, KK, Li, FC, Yung, WT, Kung, JL, Ng, JL y Cheah, KS. 1994. Influence of digits, ectoderm, and retinoic acid on chondrogenesis by mouse interdigital mesoderm in culture. *Dev Dyn* 201:297-309.
- Leucht, P, Kim, JB, Amasha, R, James, AW, Girod, S y Helms, JA. 2008. Embryonic origin and Hox status determine progenitor cell fate during adult bone regeneration. *Development* 135:2845-2854.
- Lewandoski, M, Sun, X y Martin, GR. 2000. Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nat Genet* 26:460-463.
- Lewis, JH. 1975. Fate maps and the pattern of cell division: a calculation for the chick wing-bud. *J Embryol Exp Morphol* 33:419-434.
- Li, C, Xu, X, Nelson, DK, Williams, T, Kuehn, MR y Deng, CX. 2005. FGFR1 function at the earliest stages of mouse limb development plays an indispensable role in subsequent autopod morphogenesis. *Development* 132:4755-4764.
- Li, S y Muneoka, K. 1999. Cell migration and chick limb development: chemotactic action of FGF-4 and the AER. *Dev Biol* 211:335-347.
- Li, Y, Qiu, Q, Watson, SS, Schweitzer, R y Johnson, RL. 2010. Uncoupling skeletal and connective tissue patterning: conditional deletion in cartilage progenitors reveals cell-autonomous requirements for Lmx1b in dorsal-ventral limb patterning. *Development* 137:1181-1188.
- Linehan, SA, Weber, R, McKercher, S, Ripley, RM, Gordon, S y Martin, P. 2005. Enhanced expression of the mannose receptor by endothelial cells of the liver and spleen microvascular beds in the macrophage-deficient PU.1 null mouse. *Histochem Cell Biol* 123:365-376.
- Litingtung, Y, Dahn, RD, Li, Y, Fallon, JF y Chiang, C. 2002. Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature* 418:979-983.
- Logan, C, Hornbruch, A, Campbell, I y Lumsden, A. 1997. The role of Engrailed in establishing the dorsoventral axis of the chick limb. *Development* 124:2317-2324.
- Logan, M y Tabin, CJ. 1999. Role of Pitx1 upstream of Tbx4 in specification of hindlimb identity. *Science* 283:1736-1739.
- Lohnes, D, Mark, M, Mendelsohn, C, Dolle, P, Dierich, A, Gorry, P, Gansmuller, A y Chambon, P. 1994. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* 120:2723-2748.
- Loomis, CA, Harris, E, Michaud, J, Wurst, W, Hanks, M y Joyner, AL. 1996. The mouse Engrailed-1 gene and ventral limb patterning. *Nature* 382:360-363.
- Lu, HC, Revelli, JP, Goering, L, Thaller, C y Eichele, G. 1997. Retinoid signaling is required for the establishment of a ZPA and for the expression of Hoxb-8, a mediator of ZPA formation. *Development* 124:1643-1651.
- Lu, P, Yu, Y, Perdue, Y y Werb, Z. 2008. The apical ectodermal ridge is a timer for generating distal limb progenitors. *Development* 135:1395-1405.
- Lufkin, T, Lohnes, D, Mark, M, Dierich, A, Gorry, P, Gaub, MP, LeMeur, M y Chambon, P. 1993. High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor alpha mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7225-7229.
- Luo, J, Sucov, HM, Bader, JA, Evans, RM y Giguere, V. 1996. Compound mutants for retinoic acid receptor (RAR) beta and RAR alpha 1 reveal developmental functions for multiple RAR beta isoforms. *Mech Dev* 55:33-44.
- Luo, T, Wagner, E, Grun, F y Drager, UC. 2004. Retinoic acid signaling in the brain marks formation of optic projections, maturation of the dorsal telencephalon, and function of limbic sites. *J Comp Neurol* 470:297-316.
- MacLean, G, Abu-Abed, S, Dolle, P, Tahayato, A, Chambon, P y Petkovich, M. 2001. Cloning of a novel retinoic-acid metabolizing cytochrome P450, Cyp26B1, and comparative expression analysis with Cyp26A1 during early murine development. *Mech Dev* 107:195-201.
- Maden, M. 1983a. The effect of vitamin A on the regenerating axolotl limb. *J Embryol Exp Morphol* 77:273-295.
- Maden, M. 1983b. The effect of vitamin A on limb regeneration in Rana temporaria. *Dev Biol* 98:409-416.
- Maden, M. 1983c. Vitamin A and the control of pattern in regenerating limbs. *Prog Clin Biol Res* 110 Pt A:445-454.
- Maden, M. 1994. Distribution of cellular retinoic acid-binding proteins I and II in the chick embryo and their relationship to teratogenesis. *Teratology* 50:294-301.
- Maden, M, Sonneveld, E, van der Saag, PT y Gale, E. 1998. The distribution of endogenous retinoic acid in the chick embryo: implications for developmental mechanisms. *Development* 125:4133-4144.
- Maniatis, T, Fritsch, EF y Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory. x, 545 p. pp.
- Mann, RS y Affolter, M. 1998. Hox proteins meet more partners. *Curr Opin Genet Dev* 8:423-429.
- Mao, J, McGlenn, E, Huang, P, Tabin, CJ y McMahon, AP. 2009. Fgf-dependent Etv4/5 activity is required for posterior restriction of Sonic Hedgehog and promoting outgrowth of the vertebrate limb. *Dev Cell* 16:600-606.
- Mariani, FV, Ahn, CP y Martin, GR. 2008. Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature* 453:401-405.
- Mark, M, Ghyselinck, NB y Chambon, P. 2009. Function of retinoic acid receptors during embryonic development. *Nucl Recept Signal* 7:e002.
- Marletaz, F, Holland, LZ, Laudet, V y Schubert, M. 2006. Retinoic acid signaling and the evolution of chordates. *Int J Biol Sci* 2:38-47.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Martin, GR.** 1998. The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes Dev* 12:1571-1586.
- Martinez-Ceballos, E y Burdsal, CA.** 2001. Differential expression of chicken CYP26 in anterior versus posterior limb bud in response to retinoic acid. *J Exp Zool* 290:136-147.
- McCulloch, DR, Nelson, CM, Dixon, LJ, Silver, DL, Wylie, JD, Lindner, V, Sasaki, T, Cooley, MA, Argraves, WS y Apte, SS.** 2009. ADAMTS metalloproteases generate active versican fragments that regulate interdigital web regression. *Dev Cell* 17:687-698.
- McGrew, MJ, Dale, JK, Fraboulet, S y Pourquie, O.** 1998. The lunatic fringe gene is a target of the molecular clock linked to somite segmentation in avian embryos. *Curr Biol* 8:979-982.
- McGrew, MJ, Sherman, A, Ellard, FM, Lillico, SG, Gilhooley, HJ, Kingsman, AJ, Mitrophanous, KA y Sang, H.** 2004. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep* 5:728-733.
- Mendelsohn, C, Ruberte, E y Chambon, P.** 1992. Retinoid receptors in vertebrate limb development. *Dev Biol* 152:50-61.
- Mercader, N, Leonardo, E, Azpiazu, N, Serrano, A, Morata, G, Martinez, C y Torres, M.** 1999. Conserved regulation of proximodistal limb axis development by Meis1/Hth. *Nature* 402:425-429.
- Mercader, N, Leonardo, E, Piedra, ME, Martinez, AC, Ros, MA y Torres, M.** 2000. Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of Meis genes. *Development* 127:3961-3970.
- Mercader, N, Tanaka, EM y Torres, M.** 2005. Proximodistal identity during vertebrate limb regeneration is regulated by Meis homeodomain proteins. *Development* 132:4131-4142.
- Mercader, N, Fischer, S y Neumann, CJ.** 2006. Prdm1 acts downstream of a sequential RA, Wnt and Fgf signaling cascade during zebrafish forelimb induction. *Development* 133:2805-2815.
- Mercader, N, Selleri, L, Criado, LM, Pallares, P, Parras, C, Cleary, ML y Torres, M.** 2009. Ectopic Meis1 expression in the mouse limb bud alters P-D patterning in a Pbx1-independent manner. *Int J Dev Biol* 53:1483-1494.
- Merino, R, Rodriguez-Leon, J, Macias, D, Ganan, Y, Economides, AN y Hurle, JM.** 1999. The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development* 126:5515-5522.
- Miao, H, Wei, BR, Peehl, DM, Li, Q, Alexandrou, T, Schelling, JR, Rhim, JS, Sedor, JR, Burnett, E y Wang, B.** 2001. Activation of EphA receptor tyrosine kinase inhibits the Ras/MAPK pathway. *Nat Cell Biol* 3:527-530.
- Mic, FA, Molotkov, A, Benbrook, DM y Duester, G.** 2003. Retinoid activation of retinoic acid receptor but not retinoid X receptor is sufficient to rescue lethal defect in retinoic acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7135-7140.
- Mic, FA, Sirbu, IO y Duester, G.** 2004. Retinoic acid synthesis controlled by Raldh2 is required early for limb bud initiation and then later as a proximodistal signal during apical ectodermal ridge formation. *J Biol Chem* 279:26698-26706.
- Michaud, JL, Lapointe, F y Le Douarin, NM.** 1997. The dorsoventral polarity of the presumptive limb is determined by signals produced by the somites and by the lateral somatopleure. *Development* 124:1453-1463.
- Milaire, J.** 1971. *Evolution et déterminisme des dégénérescences cellulaires au cours de la morphogenèse des membres et leurs modifications dans diverses situations tératologiques.* In: Tuchmann-Duplessis, editor. Malformations congénitales des Mammifères. Paris: Masson et Co. pp 131-149.
- Milaire, J.** 1977. Histochemical expression of morphogenetic gradients during limb morphogenesis (with particular reference to mammalian embryos). *Birth Defects Orig Artic Ser* 13:37-67.
- Min, H, Danilenko, DM, Scully, SA, Bolon, B, Ring, BD, Tarpley, JE, DeRose, M y Simonet, WS.** 1998. Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to Drosophila branchless. *Genes Dev* 12:3156-3161.
- Minguillon, C, Del Buono, J y Logan, MP.** 2005. Tbx5 and Tbx4 are not sufficient to determine limb-specific morphologies but have common roles in initiating limb outgrowth. *Dev Cell* 8:75-84.
- Minowada, G, Jarvis, LA, Chi, CL, Neubuser, A, Sun, X, Hacohen, N, Krasnow, MA y Martin, GR.** 1999. Vertebrate Sprouty genes are induced by FGF signaling and can cause chondrodysplasia when overexpressed. *Development* 126:4465-4475.
- Miura, T y Shiota, K.** 2000. TGFbeta2 acts as an "activator" molecule in reaction-diffusion model and is involved in cell sorting phenomenon in mouse limb micromass culture. *Dev Dyn* 217:241-249.
- Miyagawa-Tomita, S, Kitamoto, T, Momma, K, Takao, A y Momoi, T.** 1992. Cellular retinoic acid binding protein type II was preferentially localized in medium and posterior parts of the progress zone of the chick limb bud. *Biochem Biophys Res Commun* 185:217-223.
- Moens, CB y Selleri, L.** 2006. Hox cofactors in vertebrate development. *Dev Biol* 291:193-206.
- Mohammadi, M, McMahon, G, Sun, L, Tang, C, Hirth, P, Yeh, BK, Hubbard, SR y Schlessinger, J.** 1997. Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science* 276:955-960.
- Mollard, R, Viville, S, Ward, SJ, Decimo, D, Chambon, P y Dolle, P.** 2000. Tissue-specific expression of retinoic acid receptor isoform transcripts in the mouse embryo. *Mech Dev* 94:223-232.
- Moon, AM, Boulet, AM y Capecchi, MR.** 2000. Normal limb development in conditional mutants of Fgf4. *Development* 127:989-996.
- Moon, AM y Capecchi, MR.** 2000. Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nat Genet* 26:455-459.
- Morata, G.** 2001. How Drosophila appendages develop. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:89-97.
- Muller, U, Wang, D, Denda, S, Meneses, JJ, Pedersen, RA y Reichardt, LF.** 1997. Integrin alpha8beta1 is critically important for epithelial-mesenchymal interactions during kidney morphogenesis. *Cell* 88:603-613.
- Nagy, A.** 2003. *Manipulating the mouse embryo : a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. x, 764 p. pp.
- Naiche, LA y Papaioannou, VE.** 2003. Loss of Tbx4 blocks hindlimb development and affects vascularization and fusion of the allantois. *Development* 130:2681-2693.
- Nakamura, E, Nguyen, MT y Mackem, S.** 2006. Kinetics of tamoxifen-regulated Cre activity in mice using a cartilage-specific CreER(T) to assay temporal activity windows along the proximodistal limb skeleton. *Dev Dyn* 235:2603-2612.

- Nardi, JB y Stocum, DL. 1984. Surface properties of regenerating limb cells: Evidence for gradation along the proximodistal axis. *Differentiation* 25:5.
- Nelson, CE, Morgan, BA, Burke, AC, Laufer, E, DiMambro, E, Murtaugh, LC, Gonzales, E, Tessarollo, L, Parada, LF y Tabin, C. 1996. Analysis of Hox gene expression in the chick limb bud. *Development* 122:1449-1466.
- Nelson, LT, Rakshit, S, Sun, H y Wellik, DM. 2008. Generation and expression of a Hoxa11eGFP targeted allele in mice. *Dev Dyn* 237:3410-3416.
- Ng, JK, Kawakami, Y, Buscher, D, Raya, A, Itoh, T, Koth, CM, Rodriguez Esteban, C, Rodriguez-Leon, J, Garrity, DM, Fishman, MC y Izpisua Belmonte, JC. 2002. The limb identity gene Tbx5 promotes limb initiation by interacting with Wnt2b and Fgf10. *Development* 129:5161-5170.
- Niederreither, K, McCaffery, P, Drager, UC, Chambon, P y Dolle, P. 1997. Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech Dev* 62:67-78.
- Niederreither, K, Subbarayan, V, Dolle, P y Chambon, P. 1999. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet* 21:444-448.
- Niederreither, K, Vermot, J, Schuhbaur, B, Chambon, P y Dolle, P. 2002. Embryonic retinoic acid synthesis is required for forelimb growth and anteroposterior patterning in the mouse. *Development* 129:3563-3574.
- Niederreither, K y Dolle, P. 2008. Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nat Rev Genet* 9:541-553.
- Nissim, S, Hasso, SM, Fallon, JF y Tabin, CJ. 2006. Regulation of Gremlin expression in the posterior limb bud. *Dev Biol* 299:12-21.
- Nissim, S, Allard, P, Bandyopadhyay, A, Harfe, BD y Tabin, CJ. 2007. Characterization of a novel ectodermal signaling center regulating Tbx2 and Shh in the vertebrate limb. *Dev Biol* 304:9-21.
- Niswander, L, Tickle, C, Vogel, A, Booth, I y Martin, GR. 1993. FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell* 75:579-587.
- Niswander, L, Jeffrey, S, Martin, GR y Tickle, C. 1994. A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb. *Nature* 371:609-612.
- Njar, VC, Gediya, L, Purushottamachar, P, Chopra, P, Vasaitis, TS, Khandelwal, A, Mehta, J, Huynh, C, Belosay, A y Patel, J. 2006. Retinoic acid metabolism blocking agents (RAMBAs) for treatment of cancer and dermatological diseases. *Bioorg Med Chem* 14:4323-4340.
- Noji, S, Nohno, T, Koyama, E, Muto, K, Ohyama, K, Aoki, Y, Tamura, K, Ohsugi, K, Ide, H, Taniguchi, S y et al. 1991. Retinoic acid induces polarizing activity but is unlikely to be a morphogen in the chick limb bud. *Nature* 350:83-86.
- Novak, A, Guo, C, Yang, W, Nagy, A y Lobe, CG. 2000. Z/EG, a double reporter mouse line that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated excision. *Genesis* 28:147-155.
- Nowlan, NC, Bourdon, C, Dumas, G, Tajbakhsh, S, Prendergast, PJ y Murphy, P. 2010. Developing bones are differentially affected by compromised skeletal muscle formation. *Bone* 46:1275-1285.
- Ohuchi, H, Yoshioka, H y Noji, S. 1995. [Induction of an additional limb by FGF and duplication of digits by Sonic hedgehog]. *Seikagaku* 67:1232-1236.
- Ong, SH, Hadari, YR, Gotoh, N, Guy, GR, Schlessinger, J y Lax, I. 2001. Stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by fibroblast growth factor receptors is mediated by coordinated recruitment of multiple docking proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6074-6079.
- Ornitz, DM, Xu, J, Colvin, JS, McEwen, DG, MacArthur, CA, Coulier, F, Gao, G y Goldfarb, M. 1996. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 271:15292-15297.
- Orr-Urtreger, A, Givol, D, Yayon, A, Yarden, Y y Lonai, P. 1991. Developmental expression of two murine fibroblast growth factor receptors, flg and bek. *Development* 113:1419-1434.
- Ouimette, J, Jolin, ML, L'Honoré, A, Gifuni, A y Drouin, J. 2010. Divergent transcriptional activities determine limb identity. *Nat Commun* 1:1-9.
- Owen, R. 1849. *On the Nature of Limbs: A Discourse*. London: John van Voorst.
- Palmeirim, I, Henrique, D, Ish-Horowicz, D y Pourquie, O. 1997. Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell* 91:639-648.
- Palmeirim, I, Dubrulle, J, Henrique, D, Ish-Horowicz, D y Pourquie, O. 1998. Uncoupling segmentation and somitogenesis in the chick presomitic mesoderm. *Dev Genet* 23:77-85.
- Pan, Y, Liu, Z, Shen, J y Kopan, R. 2005. Notch1 and 2 cooperate in limb ectoderm to receive an early Jagged2 signal regulating interdigital apoptosis. *Dev Biol* 286:472-482.
- Park, HL, Bai, C, Platt, KA, Matise, MP, Beeghly, A, Hui, CC, Nakashima, M y Joyner, AL. 2000. Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development* 127:1593-1605.
- Parr, BA, Shea, MJ, Vassileva, G y McMahon, AP. 1993. Mouse Wnt genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds. *Development* 119:247-261.
- Pascoal, S, Carvalho, CR, Rodriguez-Leon, J, Delfini, MC, Duprez, D, Thorsteinsdottir, S y Palmeirim, I. 2007. A molecular clock operates during chick autopod proximal-distal outgrowth. *J Mol Biol* 368:303-309.
- Patel, K, Nittenberg, R, D'Souza, D, Irving, C, Burt, D, Wilkinson, DG y Tickle, C. 1996. Expression and regulation of Cdk-8, a cell to cell signalling receptor in developing chick limb buds. *Development* 122:1147-1155.
- Pautou, MP y Kieny, M. 1977. Proximo-Distal Pattern Regulation in Deficient Avian Limb Buds. *Roux's Archives of Developmental Biology* 183:177-191.
- Pearse, RV, 2nd, Scherz, PJ, Campbell, JK y Tabin, CJ. 2007. A cellular lineage analysis of the chick limb bud. *Dev Biol* 310:388-400.
- Pennimpede, T, Cameron, DA, Maclean, GA y Petkovich, M. 2010. Analysis of Cyp26b1/Rarg compound-null mice reveals two genetically separable effects of retinoic acid on limb outgrowth. *Dev Biol*.



## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Perantoni, AO, Timofeeva, O, Naillat, F, Richman, C, Pajni-Underwood, S, Wilson, C, Vainio, S, Dove, LF y Lewandoski, M. 2005. Inactivation of FGF8 in early mesoderm reveals an essential role in kidney development. *Development* 132:3859-3871.
- Perez, WD, Weller, CR, Shou, S y Stadler, HS. 2010. Survival of Hoxa13 homozygous mutants reveals a novel role in digit patterning and appendicular skeletal development. *Dev Dyn* 239:446-457.
- Petit, AC, Legue, E y Nicolas, JF. 2005. Methods in clonal analysis and applications. *Reprod Nutr Dev* 45:321-339.
- Pijnappel, WW, Hendriks, HF, Folkers, GE, van den Brink, CE, Dekker, EJ, Edelenbosch, C, van der Saag, PT y Durston, AJ. 1993. The retinoid ligand 4-oxo-retinoic acid is a highly active modulator of positional specification. *Nature* 366:340-344.
- Pinot, M. 1970. [Relations between somite mesenchyma and lateral plate in early organogenesis of limbs in chickens]. *Annee Biol* 9:277-284.
- Pizette, S y Niswander, L. 1999. BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge. *Development* 126:883-894.
- Pizette, S, Abate-Shen, C y Niswander, L. 2001. BMP controls proximodistal outgrowth, via induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb. *Development* 128:4463-4474.
- Power, SC, Lancman, J y Smith, SM. 1999. Retinoic acid is essential for Shh/Hoxd signaling during rat limb outgrowth but not for limb initiation. *Dev Dyn* 216:469-480.
- Pueyo, JI y Couso, JP. 2005. Parallels between the proximal-distal development of vertebrate and arthropod appendages: homology without an ancestor? *Curr Opin Genet Dev* 15:439-446.
- Qiu, Q, Chen, H y Johnson, RL. 2009. Lmx1b-expressing cells in the mouse limb bud define a dorsal mesenchymal lineage compartment. *Genesis* 47:224-233.
- Qu, S, Niswander, KD, Ji, Q, van der Meer, R, Keeney, D, Magnuson, MA y Wisdom, R. 1997. Polydactyly and ectopic ZPA formation in Alx-4 mutant mice. *Development* 124:3999-4008.
- Rallis, C, Bruneau, BG, Del Buono, J, Seidman, CE, Seidman, JG, Nissim, S, Tabin, CJ y Logan, MP. 2003. Tbx5 is required for forelimb bud formation and continued outgrowth. *Development* 130:2741-2751.
- Reijntjes, S, Gale, E y Maden, M. 2003. Expression of the retinoic acid catabolising enzyme CYP26B1 in the chick embryo and its regulation by retinoic acid. *Gene Expr Patterns* 3:621-627.
- Reijntjes, S, Gale, E y Maden, M. 2004. Generating gradients of retinoic acid in the chick embryo: Cyp26C1 expression and a comparative analysis of the Cyp26 enzymes. *Dev Dyn* 230:509-517.
- Richardson, MK, Jeffery, JE y Tabin, CJ. 2004. Proximodistal patterning of the limb: insights from evolutionary morphology. *Evol Dev* 6:1-5.
- Riddle, RD, Johnson, RL, Laufer, E y Tabin, C. 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75:1401-1416.
- Riddle, RD, Ensini, M, Nelson, C, Tsuchida, T, Jessell, TM y Tabin, C. 1995. Induction of the LIM homeobox gene Lmx1 by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell* 83:631-640.
- Rinn, JL, Bondre, C, Gladstone, HB, Brown, PO y Chang, HY. 2006. Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS Genet* 2:e119.
- Rivera-Perez, JA, Jones, V y Tam, PP. 2010. Culture of whole mouse embryos at early postimplantation to organogenesis stages: developmental staging and methods. *Methods Enzymol* 476:185-203.
- Robledo, RF, Rajan, L, Li, X y Lufkin, T. 2002. The Dlx5 and Dlx6 homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development. *Genes Dev* 16:1089-1101.
- Rodriguez, CI, Buchholz, F, Galloway, J, Sequerra, R, Kasper, J, Ayala, R, Stewart, AF y Dymecki, SM. 2000. High-efficiency deleter mice show that FLP is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* 25:139-140.
- Rodriguez-Esteban, C, Tsukui, T, Yonei, S, Magallon, J, Tamura, K y Izpisua Belmonte, JC. 1999. The T-box genes Tbx4 and Tbx5 regulate limb outgrowth and identity. *Nature* 398:814-818.
- Ros, MA, Lyons, GE, Mackem, S y Fallon, JF. 1994. Recombinant limbs as a model to study homeobox gene regulation during limb development. *Dev Biol* 166:59-72.
- Ros, MA, Simandl, BK, Clark, AW y Fallon, JF. 2000. Methods for manipulating the chick limb bud to study gene expression, tissue interactions, and patterning. *Methods Mol Biol* 137:245-266.
- Rossant, J, Zirngibl, R, Cado, D, Shago, M y Giguere, V. 1991. Expression of a retinoic acid response element-hsplaZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes Dev* 5:1333-1344.
- Roux, W. 1888. *Contributions to the developmental mechanics of the embryo. On the artificial production of half-embryos by the destruction of one of the first two blastomeres, and the later development (postgeneration) the missing half of the body*. New Jersey: Prentice Hall.
- Rowe, DA, Cairns, JM y Fallon, JF. 1982. Spatial and temporal patterns of cell death in limb bud mesoderm after apical ectodermal ridge removal. *Dev Biol* 93:83-91.
- Rowe, DA y Fallon, JF. 1982. The proximodistal determination of skeletal parts in the developing chick leg. *J Embryol Exp Morphol* 68:1-7.
- Ruberte, E, Friederich, V, Morriss-Kay, G y Chambon, P. 1992. Differential distribution patterns of CRABP I and CRABP II transcripts during mouse embryogenesis. *Development* 115:973-987.
- Rubin, L y Saunders, JW, Jr. 1972. Ectodermal-mesodermal interactions in the growth of limb buds in the chick embryo: constancy and temporal limits of the ectodermal induction. *Dev Biol* 28:94-112.
- Ruvinsky, I y Gibson-Brown, JJ. 2000. Genetic and developmental bases of serial homology in vertebrate limb evolution. *Development* 127:5233-5244.
- Salsi, V y Zappavigna, V. 2006. Hoxd13 and Hoxa13 directly control the expression of the EphA7 Ephrin tyrosine kinase receptor in developing limbs. *J Biol Chem* 281:1992-1999.

- Sandell, LL, Sanderson, BW, Moiseyev, G, Johnson, T, Mushegian, A, Young, K, Rey, JP, Ma, JX, Staehling-Hampton, K y Trainor, PA. 2007. RDH10 is essential for synthesis of embryonic retinoic acid and is required for limb, craniofacial, and organ development. *Genes Dev* 21:1113-1124.
- Sanz-Ezquerro, JJ y Tickle, C. 2000. Autoregulation of Shh expression and Shh induction of cell death suggest a mechanism for modulating polarising activity during chick limb development. *Development* 127:4811-4823.
- Sanz-Ezquerro, JJ y Tickle, C. 2003. Fgf signaling controls the number of phalanges and tip formation in developing digits. *Curr Biol* 13:1830-1836.
- Sato, K, Koizumi, Y, Takahashi, M, Kuroiwa, A y Tamura, K. 2007. Specification of cell fate along the proximal-distal axis in the developing chick limb bud. *Development* 134:1397-1406.
- Satre, MA y Kochhar, DM. 1989. Elevations in the endogenous levels of the putative morphogen retinoic acid in embryonic mouse limb-buds associated with limb dysmorphogenesis. *Dev Biol* 133:529-536.
- Saunders, JW, Jr. 1948. The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *J Exp Zool* 108:363-403.
- Saunders, JW, Jr., Gasseling, MT y Cairns, JM. 1955. Effect of implantation site on the development of an implant in the chick embryo. *Nature* 175:673-674.
- Saunders, JWJ y Gasseling, MP. 1968. *Ectodermal-mesenchymal interactions in the origin of limb symmetry*. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins.
- Savage, MP y Fallon, JF. 1995. FGF-2 mRNA and its antisense message are expressed in a developmentally specific manner in the chick limb bud and mesonephros. *Dev Dyn* 202:343-353.
- Saxena, S y Niazi, IA. 1977. Effect of vitamin A excess on hind limb regeneration in tadpoles of the toad, *Bufo andersonii* (Boulenger). *Indian J Exp Biol* 15:435-439.
- Scherz, PJ, Harfe, BD, McMahon, AP y Tabin, CJ. 2004. The limb bud Shh-Fgf feedback loop is terminated by expansion of former ZPA cells. *Science* 305:396-399.
- Scherz, PJ, McGlinn, E, Nissim, S y Tabin, CJ. 2007. Extended exposure to Sonic hedgehog is required for patterning the posterior digits of the vertebrate limb. *Dev Biol* 308:343-354.
- Schweitzer, R, Vogan, KJ y Tabin, CJ. 2000. Similar expression and regulation of Gli2 and Gli3 in the chick limb bud. *Mech Dev* 98:171-174.
- Searls, RL y Janners, MY. 1971. The initiation of limb bud outgrowth in the embryonic chick. *Dev Biol* 24:198-213.
- Sekine, K, Ohuchi, H, Fujiwara, M, Yamasaki, M, Yoshizawa, T, Sato, T, Yagishita, N, Matsui, D, Koga, Y, Itoh, N y Kato, S. 1999. Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet* 21:138-141.
- Serbedzija, GN, Bronner-Fraser, M y Fraser, SE. 1989. A vital dye analysis of the timing and pathways of avian trunk neural crest cell migration. *Development* 106:809-816.
- Sessler, RJ y Noy, N. 2005. A ligand-activated nuclear localization signal in cellular retinoic acid binding protein-II. *Mol Cell* 18:343-353.
- Shang, J, Li, X, Ring, HZ, Clayton, DA y Francke, U. 1997. Backfoot, a novel homeobox gene, maps to human chromosome 5 (BFT) and mouse chromosome 13 (Bft). *Genomics* 40:108-113.
- Shen, H, Wilke, T, Ashique, AM, Narvey, M, Zerucha, T, Savino, E, Williams, T y Richman, JM. 1997. Chicken transcription factor AP-2: cloning, expression and its role in outgrowth of facial prominences and limb buds. *Dev Biol* 188:248-266.
- Sheth, R, Bastida, MF y Ros, M. 2007. Hoxd and Gli3 interactions modulate digit number in the amniote limb. *Dev Biol* 310:430-441.
- Shubin, N y Alberch, P. 1986. *A morphogenetic approach to the origin and basic organization of the tetrapod limb*. In: Hecht M, Schaeffer B, editors. *Evolutionary Biology*. p 319-387.
- Shubin, N, Tabin, C y Carroll, S. 1997. Fossils, genes and the evolution of animal limbs. *Nature* 388:639-648.
- Simoes-Costa, MS, Azambuja, AP y Xavier-Neto, J. 2008. The search for non-chordate retinoic acid signaling: lessons from chordates. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 310:54-72.
- Smith, SM y Eichele, G. 1991. Temporal and regional differences in the expression pattern of distinct retinoic acid receptor-beta transcripts in the chick embryo. *Development* 111:245-252.
- Soriano, P. 1997. The PDGF alpha receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites. *Development* 124:2691-2700.
- Soriano, P. 1999. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21:70-71.
- Soshnikova, N, Zechner, D, Huelsken, J, Mishina, Y, Behringer, RR, Taketo, MM, Crenshaw, EB, 3rd y Birchmeier, W. 2003. Genetic interaction between Wnt/beta-catenin and BMP receptor signaling during formation of the AER and the dorsal-ventral axis in the limb. *Genes Dev* 17:1963-1968.
- Soshnikova, N y Duboule, D. 2009. Epigenetic temporal control of mouse Hox genes in vivo. *Science* 324:1320-1323.
- Southern, EM. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-517.
- Srinivas, S, Watanabe, T, Lin, CS, William, CM, Tanabe, Y, Jessell, TM y Costantini, F. 2001. Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol* 1:4.
- Stadler, HS, Higgins, KM y Capecchi, MR. 2001. Loss of Eph-receptor expression correlates with loss of cell adhesion and chondrogenic capacity in Hoxa13 mutant limbs. *Development* 128:4177-4188.
- Stark, RJ y Searls, RL. 1973. A description of chick wing bud development and a model of limb morphogenesis. *Dev Biol* 33:138-153.
- Stern, CD, Charite, J, Deschamps, J, Duboule, D, Durston, AJ, Kmita, M, Nicolas, JF, Palmeirim, I, Smith, JC y Wolpert, L. 2006. Head-tail patterning of the vertebrate embryo: one, two or many unresolved problems? *Int J Dev Biol* 50:3-15.
- Stratford, T, Horton, C y Maden, M. 1996. Retinoic acid is required for the initiation of outgrowth in the chick limb bud. *Curr Biol* 6:1124-1133.



## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Stratford, T, Logan, C, Zile, M y Maden, M. 1999. Abnormal anteroposterior and dorsoventral patterning of the limb bud in the absence of retinoids. *Mech Dev* 81:115-125.
- Stuhmer, T, Anderson, SA, Ekker, M y Rubenstein, JL. 2002. Ectopic expression of the *Dlx* genes induces glutamic acid decarboxylase and *Dlx* expression. *Development* 129:245-252.
- Sucov, HM, Murakami, KK y Evans, RM. 1990. Characterization of an autoregulated response element in the mouse retinoic acid receptor type beta gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5392-5396.
- Summerbell, D, Lewis, JH y Wolpert, L. 1973. Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature* 244:492-496.
- Summerbell, D y Lewis, JH. 1975. Time, place and positional value in the chick limb-bud. *J Embryol Exp Morphol* 33:621-643.
- Summerbell, D. 1977a. Regulation of the deficiencies along the proximal distal axis of the chick wing-bud: a quantitative analysis. *J Embryol Exp Morphol* 41:137-159.
- Summerbell, D. 1977b. Reduction of the rate of outgrowth, cell density, and cell division following removal of the apical ectodermal ridge of the chick limb-bud. *J Embryol Exp Morphol* 40:1-21.
- Summerbell, D. 1981. Evidence for regulation of growth, size and pattern in the developing chick limb bud. *J Embryol Exp Morphol* 65 Suppl:129-150.
- Summerbell, D. 1983. The effect of local application of retinoic acid to the anterior margin of the developing chick limb. *J Embryol Exp Morphol* 78:269-289.
- Summerbell, D y Harvey, F. 1983. Vitamin A and the control of pattern in developing limbs. *Prog Clin Biol Res* 110 Pt A:109-118.
- Sun, X, Lewandoski, M, Meyers, EN, Liu, YH, Maxson, RE, Jr. y Martin, GR. 2000. Conditional inactivation of *Fgf4* reveals complexity of signalling during limb bud development. *Nat Genet* 25:83-86.
- Sun, X, Mariani, FV y Martin, GR. 2002. Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature* 418:501-508.
- Suzuki, M y Kuroiwa, A. 2002. Transition of *Hox* expression during limb cartilage development. *Mech Dev* 118:241-245.
- Suzuki, T, Hasso, SM y Fallon, JF. 2008. Unique SMAD1/5/8 activity at the phalanx-forming region determines digit identity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4185-4190.
- Swalla, BJ y Xavier-Neto, J. 2008. Chordate origins and evolution. *Genesis* 46:575-579.
- Swindell, EC, Thaller, C, Sockanathan, S, Petkovich, M, Jessell, TM y Eichele, G. 1999. Complementary domains of retinoic acid production and degradation in the early chick embryo. *Dev Biol* 216:282-296.
- Szeto, DP, Rodriguez-Esteban, C, Ryan, AK, O'Connell, SM, Liu, F, Kioussi, C, Gleiberman, AS, Izpisua-Belmonte, JC y Rosenfeld, MG. 1999. Role of the Bicoid-related homeodomain factor *Pitx1* in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev* 13:484-494.
- Tabin, C y Wolpert, L. 2007. Rethinking the proximodistal axis of the vertebrate limb in the molecular era. *Genes Dev* 21:1433-1442.
- Takase, S, Ong, DE y Chytil, F. 1986. Transfer of retinoic acid from its complex with cellular retinoic acid-binding protein to the nucleus. *Arch Biochem Biophys* 247:328-334.
- Takeuchi, JK, Koshiba-Takeuchi, K, Matsumoto, K, Vogel-Hopker, A, Naitoh-Matsuo, M, Ogura, K, Takahashi, N, Yasuda, K y Ogura, T. 1999. *Tbx5* and *Tbx4* genes determine the wing/leg identity of limb buds. *Nature* 398:810-814.
- Takeuchi, JK, Koshiba-Takeuchi, K, Suzuki, T, Kamimura, M, Ogura, K y Ogura, T. 2003. *Tbx5* and *Tbx4* trigger limb initiation through activation of the Wnt/*Fgf* signaling cascade. *Development* 130:2729-2739.
- Tamura, K, Yokouchi, Y, Kuroiwa, A y Ide, H. 1997. Retinoic acid changes the proximodistal developmental competence and affinity of distal cells in the developing chick limb bud. *Dev Biol* 188:224-234.
- Tarchini, B y Duboule, D. 2006. Control of *Hoxd* genes' collinearity during early limb development. *Dev Cell* 10:93-103.
- Tarchini, B, Duboule, D y Kmita, M. 2006. Regulatory constraints in the evolution of the tetrapod limb anterior-posterior polarity. *Nature* 443:985-988.
- Taylor, GP, Anderson, R, Reginelli, AD y Muneoka, K. 1994. FGF-2 induces regeneration of the chick limb bud. *Dev Biol* 163:282-284.
- te Welscher, P, Fernandez-Teran, M, Ros, MA y Zeller, R. 2002a. Mutual genetic antagonism involving *GLI3* and *dHAND* prepatterns the vertebrate limb bud mesenchyme prior to *SHH* signaling. *Genes Dev* 16:421-426.
- te Welscher, P, Zuniga, A, Kuijper, S, Drenth, T, Goedemans, HJ, Meijlink, F y Zeller, R. 2002b. Progression of vertebrate limb development through *SHH*-mediated counteraction of *GLI3*. *Science* 298:827-830.
- ten Berge, D, Brugmann, SA, Helms, JA y Nusse, R. 2008. Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development. *Development* 135:3247-3257.
- Testa, G, Zhang, Y, Vintersten, K, Benes, V, Pijnappel, WW, Chambers, I, Smith, AJ, Smith, AG y Stewart, AF. 2003. Engineering the mouse genome with bacterial artificial chromosomes to create multipurpose alleles. *Nat Biotechnol* 21:443-447.
- Thaller, C y Eichele, G. 1987. Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud. *Nature* 327:625-628.
- Thaller, C y Eichele, G. 1990. Isolation of 3,4-didehydroretinoic acid, a novel morphogenetic signal in the chick wing bud. *Nature* 345:815-819.
- Thomas, WA, Edelman, BA, Lobel, SM, Breitbart, AS y Steinberg, MS. 1981. Two chick embryonic adhesion systems: molecular vs tissue specificity. *J Supramol Struct Cell Biochem* 16:15-27.
- Tickle, C, Summerbell, D y Wolpert, L. 1975. Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis. *Nature* 254:199-202.
- Tickle, C. 1981. The number of polarizing region cells required to specify additional digits in the developing chick wing. *Nature* 289:295-298.
- Tickle, C, Alberts, B, Wolpert, L y Lee, J. 1982. Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region. *Nature* 296:564-566.

- Tickle, C, Lee, J y Eichele, G.** 1985. A quantitative analysis of the effect of all-trans-retinoic acid on the pattern of chick wing development. *Dev Biol* 109:82-95.
- Tickle, C.** 1995. Vertebrate limb development. *Curr Opin Genet Dev* 5:478-484.
- Tiecke, E, Bangs, F, Blaschke, R, Farrell, ER, Rappold, G y Tickle, C.** 2006. Expression of the short stature homeobox gene Shox is restricted by proximal and distal signals in chick limb buds and affects the length of skeletal elements. *Dev Biol* 298:585-596.
- Todt, WL y Fallon, JF.** 1984. Development of the apical ectodermal ridge in the chick wing bud. *J Embryol Exp Morphol* 80:21-41.
- Todt, WL y Fallon, JF.** 1986. Development of the apical ectodermal ridge in the chick leg bud and a comparison with the wing bud. *Anat Rec* 215:288-304.
- Tong, C, Li, P, Wu, NL, Yan, Y y Ying, QL.** 2010. Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* 467:211-213.
- Topol, L, Jiang, X, Choi, H, Garrett-Beal, L, Carolan, PJ y Yang, Y.** 2003. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J Cell Biol* 162:899-908.
- Torres, M.** 1998. The use of embryonic stem cells for the genetic manipulation of the mouse. *Curr Top Dev Biol* 36:99-114.
- Towers, M, Mahood, R, Yin, Y y Tickle, C.** 2008. Integration of growth and specification in chick wing digit-patterning. *Nature* 452:882-886.
- Towers, M y Tickle, C.** 2009. Growing models of vertebrate limb development. *Development* 136:179-190.
- Valerius, MT, Patterson, LT, Feng, Y y Potter, SS.** 2002. Hoxa 11 is upstream of Integrin alpha8 expression in the developing kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8090-8095.
- Van Heusden, J, Van Ginckel, R, Bruwier, H, Moelans, P, Janssen, B, Floren, W, van der Leede, BJ, van Dun, J, Sanz, G, Venet, M, Dillen, L, Van Hove, C, Willemsens, G, Janicot, M y Wouters, W.** 2002. Inhibition of all-TRANS-retinoic acid metabolism by R116010 induces antitumour activity. *Br J Cancer* 86:605-611.
- Vargesson, N, Clarke, JD, Vincent, K, Coles, C, Wolpert, L y Tickle, C.** 1997. Cell fate in the chick limb bud and relationship to gene expression. *Development* 124:1909-1918.
- Vargesson, N, Kostakopoulou, K, Drossopoulou, G, Papageorgiou, S y Tickle, C.** 2001. Characterisation of hoxa gene expression in the chick limb bud in response to FGF. *Dev Dyn* 220:87-90.
- Verheyden, JM y Sun, X.** 2008. An Fgf/Gremlin inhibitory feedback loop triggers termination of limb bud outgrowth. *Nature* 454:638-641.
- Vogel, A, Rodriguez, C, Warnken, W y Izpisua Belmonte, JC.** 1995. Dorsal cell fate specified by chick Lmx1 during vertebrate limb development. *Nature* 378:716-720.
- Vogel, A, Rodriguez, C y Izpisua-Belmonte, JC.** 1996. Involvement of FGF-8 in initiation, outgrowth and patterning of the vertebrate limb. *Development* 122:1737-1750.
- Wada, N, Kimura, I, Tanaka, H, Ide, H y Nohno, T.** 1998. Glycosylphosphatidylinositol-anchored cell surface proteins regulate position-specific cell affinity in the limb bud. *Dev Biol* 202:244-252.
- Wada, N, Tanaka, H, Ide, H y Nohno, T.** 2003. Ephrin-A2 regulates position-specific cell affinity and is involved in cartilage morphogenesis in the chick limb bud. *Dev Biol* 264:550-563.
- Wagner, GP y Chiu, CH.** 2001. The tetrapod limb: a hypothesis on its origin. *J Exp Zool* 291:226-240.
- Wanek, N, Muneoka, K, Holler-Dinsmore, G, Burton, R y Bryant, SV.** 1989. A staging system for mouse limb development. *J Exp Zool* 249:41-49.
- Wanek, N, Gardiner, DM, Muneoka, K y Bryant, SV.** 1991. Conversion by retinoic acid of anterior cells into ZPA cells in the chick wing bud. *Nature* 350:81-83.
- Wang, B, Fallon, JF y Beachy, PA.** 2000. Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* 100:423-434.
- Wang, C, Ruther, U y Wang, B.** 2007. The Shh-independent activator function of the full-length Gli3 protein and its role in vertebrate limb digit patterning. *Dev Biol* 305:460-469.
- Wellik, DM y Capecchi, MR.** 2003. Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. *Science* 301:363-367.
- White, RJ, Nie, Q, Lander, AD y Schilling, TF.** 2007. Complex regulation of cyp26a1 creates a robust retinoic acid gradient in the zebrafish embryo. *PLoS Biol* 5:e304.
- Wilkie, AO, Patey, SJ, Kan, SH, van den Ouweland, AM y Hamel, BC.** 2002. FGFs, their receptors, and human limb malformations: clinical and molecular correlations. *Am J Med Genet* 112:266-278.
- Wolff, E y Hampe, A.** 1954. [Regulation of the chick foot after section of an intermediate segment from a limb bud.]. *C R Seances Soc Biol Fil* 148:154-156.
- Wolpert, L.** 1969. Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theor Biol* 25:1-47.
- Wolpert, L, Tickle, C y Sampford, M.** 1979. The effect of cell killing by x-irradiation on pattern formation in the chick limb. *J Embryol Exp Morphol* 50:175-193.
- Wolpert, L y Hornbruch, A.** 1981. Positional signalling along the anteroposterior axis of the chick wing. The effect of multiple polarizing region grafts. *J Embryol Exp Morphol* 63:145-159.
- Woltering, JM y Duboule, D.** 2010. The origin of digits: expression patterns versus regulatory mechanisms. *Dev Cell* 18:526-532.
- Wood, W, Turmaine, M, Weber, R, Camp, V, Maki, RA, McKercher, SR y Martin, P.** 2000. Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development* 127:5245-5252.
- Wyngaarden, LA y Hopyan, S.** 2008. Plasticity of proximal-distal cell fate in the mammalian limb bud. *Dev Biol* 313:225-233.
- Wyngaarden, LA, Vogeli, KM, Ciruna, BG, Wells, M, Hadjantonakis, AK y Hopyan, S.** 2010. Oriented cell motility and division underlie early limb bud morphogenesis. *Development* 137:2551-2558.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Xu, X, Weinstein, M, Li, C, Naski, M, Cohen, RI, Ornitz, DM, Leder, P y Deng, C. 1998. Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development* 125:753-765.
- Yajima, H, Yoneitamura, S, Watanabe, N, Tamura, K y Ide, H. 1999. Role of N-cadherin in the sorting-out of mesenchymal cells and in the positional identity along the proximodistal axis of the chick limb bud. *Dev Dyn* 216:274-284.
- Yajima, H, Hara, K, Ide, H y Tamura, K. 2002. Cell adhesiveness and affinity for limb pattern formation. *Int J Dev Biol* 46:897-904.
- Yamaguchi, TP, Bradley, A, McMahon, AP y Jones, S. 1999. A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* 126:1211-1223.
- Yamamoto, M y Kuroiwa, A. 2003. Hoxa-11 and Hoxa-13 are involved in repression of MyoD during limb muscle development. *Dev Growth Differ* 45:485-498.
- Yang, Y y Niswander, L. 1995. Interaction between the signaling molecules WNT7a and SHH during vertebrate limb development: dorsal signals regulate anteroposterior patterning. *Cell* 80:939-947.
- Yang, Y, Drossopoulou, G, Chuang, PT, Duprez, D, Marti, E, Bumcrot, D, Vargesson, N, Clarke, J, Niswander, L, McMahon, A y Tickle, C. 1997. Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. *Development* 124:4393-4404.
- Yashiro, K, Zhao, X, Uehara, M, Yamashita, K, Nishijima, M, Nishino, J, Saijoh, Y, Sakai, Y y Hamada, H. 2004. Regulation of retinoic acid distribution is required for proximodistal patterning and outgrowth of the developing mouse limb. *Dev Cell* 6:411-422.
- Yokouchi, Y, Sasaki, H y Kuroiwa, A. 1991. Homeobox gene expression correlated with the bifurcation process of limb cartilage development. *Nature* 353:443-445.
- Yokouchi, Y, Nakazato, S, Yamamoto, M, Goto, Y, Kameda, T, Iba, H y Kuroiwa, A. 1995. Misexpression of Hoxa-13 induces cartilage homeotic transformation and changes cell adhesiveness in chick limb buds. *Genes Dev* 9:2509-2522.
- Yu, K y Ornitz, DM. 2008. FGF signaling regulates mesenchymal differentiation and skeletal patterning along the limb bud proximodistal axis. *Development* 135:483-491.
- Yu, L, Liu, H, Yan, M, Yang, J, Long, F, Muneoka, K y Chen, Y. 2007. Shox2 is required for chondrocyte proliferation and maturation in proximal limb skeleton. *Dev Biol* 306:549-559.
- Zakany, J y Duboule, D. 1999. Hox genes in digit development and evolution. *Cell Tissue Res* 296:19-25.
- Zakany, J, Kmita, M y Duboule, D. 2004. A dual role for Hox genes in limb anterior-posterior asymmetry. *Science* 304:1669-1672.
- Zakany, J, Zacchetti, G y Duboule, D. 2007. Interactions between HOXD and Gli3 genes control the limb apical ectodermal ridge via Fgf10. *Dev Biol* 306:883-893.
- Zambrowicz, BP, Imamoto, A, Fiering, S, Herzenberg, LA, Kerr, WG y Soriano, P. 1997. Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3789-3794.
- Zeller, R, Lopez-Rios, J y Zuniga, A. 2009. Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nat Rev Genet* 10:845-858.
- Zhang, J, Wagh, P, Guay, D, Sanchez-Pulido, L, Padhi, BK, Korzh, V, Andrade-Navarro, MA y Akimenko, MA. 2010a. Loss of fish actinotrichia proteins and the fin-to-limb transition. *Nature* 466:234-237.
- Zhang, X, Ibrahimi, OA, Olsen, SK, Umemori, H, Mohammadi, M y Ornitz, DM. 2006. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem* 281:15694-15700.
- Zhang, Z, Verheyden, JM, Hassell, JA y Sun, X. 2009. FGF-regulated Etv genes are essential for repressing Shh expression in mouse limb buds. *Dev Cell* 16:607-613.
- Zhang, Z, Sui, P, Dong, A, Hassell, J, Cserjesi, P, Chen, YT, Behringer, RR y Sun, X. 2010b. Preaxial polydactyly: interactions among ETV, TWIST1 and HAND2 control anterior-posterior patterning of the limb. *Development*.
- Zhao, X, Sirbu, IO, Mic, FA, Molotkova, N, Molotkov, A, Kumar, S y Duester, G. 2009. Retinoic acid promotes limb induction through effects on body axis extension but is unnecessary for limb patterning. *Curr Biol* 19:1050-1057.
- Zhao, X, Brade, T, Cunningham, TJ y Duester, G. 2010. Retinoic acid controls expression of tissue remodeling genes Hmgn1 and Fgf18 at the digit-interdigit junction. *Dev Dyn* 239:665-671.
- Zhao, Y y Potter, SS. 2001. Functional specificity of the Hoxa13 homeobox. *Development* 128:3197-3207.
- Zhu, J, Nakamura, E, Nguyen, MT, Bao, X, Akiyama, H y Mackem, S. 2008. Uncoupling Sonic hedgehog control of pattern and expansion of the developing limb bud. *Dev Cell* 14:624-632.
- Zuniga, A, Haramis, AP, McMahon, AP y Zeller, R. 1999. Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. *Nature* 401:598-602.
- Zuniga, A y Zeller, R. 1999. Gli3 (Xt) and formin (ld) participate in the positioning of the polarising region and control of posterior limb-bud identity. *Development* 126:13-21.
- Zwilling, E. 1956. Interaction between limb-bud ectoderm and mesoderm in the chick embryo. II. Experimental limb duplication. *J. Exp. Zool.* 132:173-187.
- Zwilling, E. 1964. Development of Fragmented and of Dissociated Limb Bud Mesoderm. *Dev Biol* 89:20-37.

## **IX. APÉNDICES**





## IX.1 Abreviaturas, términos en inglés.

**AER:** Apical ectodermal ridge. Cresta ectodérmica apical.

**A-P:** Antero – posterior.

**BMP:** Bone morphogenetic protein. Proteína morfogenética del hueso.

**Célula ES:** Célula troncal (madre) embrionaria.

**Cluster:** Grupo de células o Conjunto de genes que están relativamente juntos en una región cromosómica definida.

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico.

**D-V:** Dorso – ventral.

**Enhancer:** Secuencia potenciadora de transcripción.

**FGF:** Fibroblast growth factor. Factor de crecimiento fibroblástico.

**FGFR:** FGF receptor. Receptor de FGF.

**FL:** Forelimb. Extremidad superior.

**HL:** Hindlimb. Extremidad inferior.

**htt:** horas tras el trasplante.

**IM:** Mesodermo intermedio.

**IRES:** Internal ribosome entry site. Sitio interno de entrada al ribosoma.

**LPM:** Mesodermo de la placa lateral.

**Meis:** Myeloid ecotropic viral integration site.

**Microarray:** Superficie sobre la que se han inmovilizado sondas de DNA que en total son capaces de unir idealmente cualquier secuencia de un genoma o transcriptoma.

**mRNA:** RNA mensajero.

**pb:** pares de bases.

**PCR:** Polymerase chain reaction. Reacción en cadena de la polimerasa.

**P-D:** Próximo – distal.

**RA:** Retinoic acid. Ácido retinoico.

**Raldh:** Retinaldheyde dehydrogenase. Deshidrogenasa de retinal.

**RAR:** Retinoic acid receptor. Receptor de ácido retinoico.

**RARE:** RA response element. Elemento de respuesta a ácido retinoico. Secuencia genómica a la que se unen los receptores nucleares para mediar los efectos transcripcionales de RA.

**RNA:** Ácido ribonucleico.

**Sd:** desviación estándar.

**Sorting out:** Proceso por el que células con distintas propiedades de adhesión se separan unas de otras, usualmente en cultivo.

**Splicing:** procesamiento post-transcripcional del mRNA, que implica la eliminación de intrones y unión de exones entre sí.

**Turning:** Proceso por el cual el embrión de ratón se gira sobre sí mismo, hasta que el ectodermo y el endodermo quedan en su posición definitiva. Ocurre a E8.5.

**UTR:** Untranslated region. Región del gen que es transcrita pero no traducida, y que usualmente flanquea la secuencia codificante.

**Whole mount:** referido a una técnica empleada sobre embriones o extremidades completos.

**Wnt:** Wingless and Int.

**WT:** silvestre

**ZPA:** Zona de actividad polarizante.

### IX.2 Preguntas técnicas frecuentes.

Teniendo en cuenta cuál es el tema principal de esta tesis, no sé cómo de útil resultará para la gente que trabaja en un departamento centrado en cardiovascular. No obstante, los “truquillos” empleados en los diversos protocolos sí que son aplicables, así que he decidido escribir esta sección, por si pudiera servir de ayuda. He de aclarar que en algunos casos, el que un protocolo salga incluso cuando se hace en condiciones adversas, no significa que se deba hacer así por sistema. Lo mejor es hacerlo “estándar”, pero si se da la circunstancia, se puede probar la opción mencionada antes de tirar el experimento a la basura.

- Pregunta: *Si después de hacer una inmuno con un anticuerpo que sé que funciona, no veo señal, ¿merece la pena repetir la inmuno sobre la misma muestra?*

- Respuesta: Rotundamente sí. Por extraño que parezca, suele funcionar. Incluso con técnicas enzimáticas como el TUNEL, si parte de la muestra no tiene señal, se puede repetir la técnica con bastantes probabilidades de éxito.

- P: *¿Y con una hibridación in situ?*

- R: En este caso, depende de dónde estuviera el problema. Si el problema fue que no se añadió anticuerpo, o éste no penetró, se puede repetir y probablemente funcionará. Si el problema estuvo en la sonda, no hay nada que hacer. Repetir la hibridación sobre la misma muestra no es la solución.

- P: *Al igual que en las inmunos se reutilizan los anticuerpos, ¿se puede hacer lo mismo con las ribosondas?*

- R: En el laboratorio lo hacemos rutinariamente con las sondas utilizadas para hibridación *whole mount*. Yo algunas las he llegado a usar hasta 10 veces y siguen funcionando bien, aunque de vez en cuando añado algo de sonda nueva por si acaso. También he llegado a recuperar sonda de los portas en hibridaciones en secciones, apoyando una esquina del porta en un tubo eppendorf. El problema es que se recupera muy poco de cada porta, pero funciona bastante bien. De nuevo, añadir un poco de sonda extra (menos de lo que se pondría en condiciones normales, obviamente), puede ser una buena práctica.

- P: *Según el protocolo de síntesis de ribosondas, hay que usar entre 500 ng y 1 µg de DNA lineal para la transcripción in vitro. La purificación de la banda lineal con el kit de Qiagen no me da tanta cantidad de DNA. ¿Qué puedo hacer?*

- R: Hay laboratorios en los que la banda lineal no se purifica, simplemente se precipita, tras asegurarse de que la digestión con la enzima de restricción ha sido completa. Yo prefiero purificar la banda, pero lo que hago es usar sólo 100-200 ng para la reacción de transcripción. Tras unas horas a 37°C, el rendimiento es más que satisfactorio.

- P: *¿Se puede utilizar mezcla de hibridación preparada para whole mount para hacer una hibridación en secciones?*

- R: Al menos dos personas lo hemos probado y funciona muy bien.

- P: *El protocolo de in situ es demasiado largo, ¿hay alguna manera de acortarlo?*

- R: La única manera real de acortarlo es realizar la incubación con anticuerpo a temperatura ambiente durante 2 horas en lugar de toda la noche a 4°C. Así, en el mismo día se pueden hacer los lavados para eliminar el anticuerpo. Además, en el caso de las *whole mount*, si la sonda es buena puede omitirse el último lavado con TBST (el que se hace toda la noche a

4°C), a cambio de haber hecho más lavados y más frecuentes durante el día, y así se puede empezar el revelado ese mismo día.

Hay otra opción, que no implica un acortamiento real del protocolo, pero que lo hace más flexible. Hay laboratorios en los que rutinariamente, tras hacer la prehibridación, se guardan los embriones a -20°C. Esto permite parar el protocolo y continuarlo un tiempo indefinido después. Yo lo he probado y funciona bien.

- P: *He deshidratado mis embriones hasta metanol, pero ahora me he dado cuenta de que me vendría bien tenerlos en etanol para poder incluirlos en parafina. ¿Es posible?*
- R: Sí. Lo que yo hago es pasarlos de 100% metanol a 70% etanol (varios lavados), y luego continuar hasta 100% etanol, xilol, etc. Al revés (de etanol a metanol) no lo he hecho nunca, pero debería funcionar igual de bien.
- P: *¿Hay alguna manera rápida de detectar la presencia de un inserto y su orientación cuando se hacen subclonajes?*
- R: Sí, hay una alternativa al análisis de restricción. Muchos laboratorios hacen una PCR directamente de las colonias de bacterias, usando un oligonucleótido dentro del inserto y otro en el plásmido donde se ha hecho el subclonaje. Sólo las colonias con una orientación concreta darán lugar a un producto de PCR. Tras preparar la mezcla de PCR y repartirla en tubos, las colonias se pican con un palillo estéril, se mojan en la mezcla con un movimiento de rotación repetitivo, y el mismo palillo se puede usar para inocular un tubo con LB que servirá para hacer un minicultivo. El programa de PCR es estándar, con 54-55°C de temperatura de *annealing*. Dos horas después, antes de que los minicultivos estén listos, ya se conocerá qué colonias son las de interés.
- P: *Ya he preparado la mezcla de PCR, pero la obtención del DNA molde se ha retrasado, o el termociclador está inesperadamente ocupado. ¿Se puede guardar la mezcla de PCR hasta el día siguiente?*
- R: Sólo me ha pasado una vez, guardé la mezcla a 4°C hasta el día siguiente, y la PCR salió bien. Evidentemente, yo no lo haría por sistema.
- P: *La reacción de TUNEL emplea mucho material muy caro. ¿Se puede usar menos?*
- R: Varios de nosotros hemos comprobado que la TdT y los nucleótidos marcados se pueden usar a la mitad de la concentración que recomienda el fabricante, sin que eso afecte a la calidad del resultado.
- P: *Los cortes en parafina de patas o alas muy avanzados tardan mucho tiempo en estirarse en el baño de agua caliente. ¿Hay otra manera de hacerlo?*
- R: En muchos laboratorios, en lugar de usar un baño de agua caliente, lo que hacen es colocar agua caliente sobre los portas, de manera que las secciones se pueden seguir colocando sin necesidad de esperar a que las anteriores se estiren. Cuando ya todas las secciones se han estirado, basta con retirar con cuidado el exceso de agua.
- P: *Voy a hacer experimentos de implantación de microesferas varios días seguidos. ¿Se pueden usar en días sucesivos las microesferas preparadas el primer día?*
- R: No es muy recomendable.
- P: *Mis experimentos de manipulación del embrión de pollo se caracterizan por una mortalidad muy alta. ¿Qué puedo hacer?*

## **IX. APÉNDICES**

---

- R: Margaret Kirby me recomendó una vez que redujera todo lo posible la ventana a través de la cual operaba los pollos. Según ella, con práctica se puede llegar a manipular el embrión a través de un agujero no mayor que la uña del meñique. Yo no pude bajar del tamaño de la uña del pulgar, pero desde luego tuvo un efecto importante en la supervivencia. Además, es recomendable usar antibióticos en el PBS para todo experimento que implique más de un día de incubación tras la manipulación.

# **AGRADECIMIENTOS**





Ésta es sin duda una de las secciones más importantes, porque mucha gente ha contribuido a esta tesis, ya sea con su trabajo, su apoyo, su inspiración, sus enseñanzas o su amistad. Un compañero del laboratorio recomendaba no dejar su escritura para el final, cuando ya estás cansado y te pilla el toro, así que he decidido hacerle caso y escribirla al principio. A pesar de todo, seguro que me olvido de incluir a alguien que merece ser nombrado, así que desde ya pido perdón por ello. Notaréis también que agradezco a la gente por cosas que ocurrieron antes de que empezara la tesis. Lo hago porque considero que esas experiencias formaron parte del camino que me ha llevado hasta aquí.

Antes de nada, y aunque suene raro o incluso “flipado”, me gustaría dar las gracias a todos los grandes científicos de tiempos pasados que pusieron a nuestra disposición sus hombros de gigantes para que nosotros pudiéramos ver un poco más allá. Sin pretender que la lista sea exhaustiva, no quiero dejar de nombrar a Abraham Trembley, Darwin y Wallace, Roux, Spallanzani, Thomas Morgan, Frederick Sanger, Watson y Crick, Lewis Wolpert o Richard Roberts.

Pasando ya a personas menos famosas pero más importantes para mí, el primer lugar de la lista es para mis padres. Soy lo que soy y como soy gracias a vosotros (¿había alguna duda sobre a qué me iba a dedicar siendo mis padres biólogos?). Os lo debo prácticamente todo, así que no hay palabras para agradeceros el cariño, el apoyo, la educación y los valores que me habéis transmitido. Simple y llanamente... sois los mejores. Gracias también a mi hermana Elena, con la que siempre mantuve una sana competitividad para ver quién sacaba mejores notas. Apuesto a que serás una cirujana cardíaca estupenda (¿crees que lo de hacer trasplantes se lleva en los genes?).

Y ya que estamos con la familia, por supuesto gracias a mis tíos y a mis primos (sobre todo a Iñaki, que sabe lo que es pasar por una tesis), y especialmente a mis abuelos, que aunque supongo que nunca entendieron a qué me dedicaba (“eso de la bioquímica... ¿qué es?” me decían), siempre me apoyaron mucho.

Un caso parecido es mi familia política. Gracias a mis suegros, Pilar y Santiago, y también a Ana, Nacho y Fernando, por mostrarnos un apoyo incondicional a lo largo de estos años, pese a que no os cuadre mucho eso de “echar más horas que el reloj” sin un sueldo y un reconocimiento social acorde. Y gracias también a mis sobrinos, Laura y Jorge, por tener tanta curiosidad (todavía me acuerdo con qué fascinación mirabais el nido de avispas que encontramos en San Mateo). Espero que alguno se haga científico... pese a las picaduras recibidas.

A los amigos que conservo del colegio, instituto y universidad (Pablo, Guillermo, Jesús, Carlos, Ricardo, Jorge, Juan Antonio, Ana, Merche, Elena, Marisol y Blanca): gracias por los grandes momentos compartidos, ya sea preparando paquitos chocolateros en un apartamento en Salou, jugando al Risk, viajando por Túnez o estudiando inmunología en la biblioteca de la CAI.

En cuanto a los amigos roleros de Zaragoza (Avelino el Cilmerio, Chemerry de la Comarca, Edu de Gondor, Gabi el Jevi, soldado Jon, Jabbi the Hutt, Niebloska beta-tester y Sergimly): gracias por tantas (aunque cada vez menos) y tan increíbles partidas de rol, que tan bien me vienen para relajarme y desconectar. Gracias también por interesaros por los avances en la creación de mi “ejército de pollos mutantes con patas en la cabeza para conquistar el mundo”. Y

## AGRADECIMIENTOS

---

eso que aún no habéis visto mi ejército de clones... Gracias también a las sufridas chicas de estos gañanes: Eva, Vanessa, Sandra, Raquel, Pilar y Esther, por mantener su salud mental en niveles aceptables.

También quisiera dar las gracias a Isabel, los Jorges y Bea, por vuestro interés sobre cómo iban nuestras tesis... y por expresar vuestra preferencia sobre dónde queréis que vayamos de postdoc ☺.

No quisiera olvidarme de aquellos profesores de ciencias tanto del instituto como de la universidad que supieron hacer algo más que dar sus clases y marcharse. Gracias a Begoña, Rosa Clavo, José Luis Andreu, José Ignacio Valenzuela, Andrés Piñeiro, Javier Sancho, Acisclo Pérez-Martos y sobre todo a Julio “metralleta” Montoya y Toño “naive question” Enríquez. Gracias también a Alberto y Jon por aguantarme aquel verano de 2003 en el que intenté aprender algo más sobre estructura de proteínas.

Pasando ya a los últimos cinco años, me gustaría mencionar a los estupendos compañeros que tuvimos en el DIO, cuando estábamos en el CNB. Gracias a Esther, María Almena, María Siliceo, Toñi, Teresa, M<sup>a</sup> Ángeles, Ernesto, Sonia, Laura, María López-Bravo, Manu, Fran, Miriam, Isabela, Domingo, Ana, Carol, Marisol y Reme, Coral y María, Pepe, Cathy, Antonio... por crear un ambiente inmejorable.

Mención aparte merecen Dani Lucas y Jesús Sánchez. Gracias Dani, por tus consejos, tus enseñanzas, tu frikismo y tu amistad. A ver si vuelves de las Américas, que te echamos de menos. En cuanto a Jesús, gracias por tu optimismo contagioso, tu apoyo incondicional y tu energía desbordante, sólo superada por tu imaginación.

Gracias también a mi tutor, Alberto Martínez Serrano, por ser posiblemente uno de los pocos tutores que se leen a fondo el DEA de sus tutelados y hacen comentarios constructivos.

En lo que respecta a mi laboratorio, otro que merece mucho más de lo que puedo expresar con palabras es Miguel. Gracias por enseñarnos tu forma de hacer ciencia, buscando el equilibrio entre los proyectos más seguros y tranquilizadores, y los proyectos geniales pero arriesgados (las llamadas ideas felices). Hay una frase de Albert Einstein que resume esta valiente actitud a la perfección: “Sólo los que intentan lo absurdo consiguen lo imposible”. Gracias también por el enorme esfuerzo económico depositado en mis proyectos, pese a no tratar el tema cardiovascular. Me refiero a los ratones *knock-in*, los inhibidores químicos que mandamos sintetizar, los *microarrays*, mi salario cuando me quedé sin beca por absurdecas burocráticas... Soy consciente de que se me ha dado un Ferrari, así que sólo espero que mi pilotaje haya estado a la altura. Pero no es eso lo que más valoro. Lo que más he apreciado a lo largo de estos años ha sido el entusiasmo que eres capaz de transmitir cuando te gusta un proyecto, esa pasión por la ciencia que nos ayuda a seguir dándolo todo cada día, aunque el cansancio se acumule (hay otra cita que también viene al caso, esta vez de John Stuart Mill, aunque perfectamente podría ser tuya: “Un discípulo de quien jamás se pide nada que no pueda hacer, nunca hace todo lo que puede”). También quiero agradecerle que confiara en mi criterio cuando (parecía que) sabía lo que hacía, y que me guiara cuando estaba más perdido, así como los consejos personales y profesionales para encarar el futuro. Gracias, en definitiva, por ser un mentor además de un jefe.

Gracias a Cristina, tan sabia como alta, por sacar tiempo de donde fuera para resolverme dudas o enseñarme con exquisita meticulosidad alguna técnica; a Carlos, la persona más parecida al doctor House que conozco (lo digo como un cumplido), por enseñarme truquillos de biología molecular (la PCR directamente de las colonias de bacterias es la que más triunfa); a Cati Ana la tenaz, por servir de ejemplo de dedicación; a Jesús, el mejor compañero que se puede tener, y un amigo al que le puedes contar cualquier cosa (gracias también a Cris, tu mujer, por ser tan comprensiva y hacer compañía a Pilar cuando yo pasé varias semanas en Santander o EEUU); a Clara la estoica, porque sin ti el labo ya no es lo mismo; a Estefanía, Silvia, Joana y Susana por genotiparme los ratones y así hacerme la vida infinitamente más fácil; a Dani, mi joven padawan, por decidir dedicarte al limb, por tu apoyo en los momentos difíciles y porque me temo que he aprendido más de ti que tú de mí; a Rocío, simpática como pocas, por ayudarme con alguna que otra tarea tediosa y alguna PCR y hacerme partícipe de todas esas cosas que pasan en el labo y de las que yo no me suelo enterar; a Adrian, Ricardo y Mónica, por aportar ese toque de sabiduría exótica; a Cris Villa, por tu energía inagotable y tus ganas de aprender; a Laura P., por intentar que no se me olvidara del todo cómo hablar francés; a la Dra. Carramolino, por compartir con nosotros su experiencia, su sabiduría y su salero; a Silvia MP., por tus ánimos; a Beatriz, por preocuparte tanto para que todo funcione bien; a Sandra, lady hiker, por ser la personificación de la eficiencia y el humor ácido; a Teresa, por los múltiples pedidos realizados; a Ángel, por sus consejos para cuantificar imágenes de fluorescencia; a Nadia, por haber hecho un trabajo tan bonito y elegante y después haberme pasado el testigo sin dejar de aportar ideas; a Juanma, uno de los tíos más “geñales” que he conocido, por tu apoyo, por ayudarme a rellenar mis lagunas en biología (para el que no lo sepa, soy bioquímico con base de químico) y por enseñarme a apreciar la belleza de la fluorescencia; a Marina, porque pocas personas hablan con tanto entusiasmo de su trabajo; a Edu, the Lord of the Fish, por ser Único; a Juanjo, sensei de los polleros, por compartir mi predilección por los trabajos clásicos; спасибо Verónica, más friki de lo que te piensas, por creer que siempre tendría respuesta a tus preguntas, y por no decepcionarte cuando no la tenía; a Claudio, también conocido como la Claudipedia, por prestarme reactivos cuando se me acababan, por tus consejos con las inmunes y porque contigo se puede hablar de cualquier tema; a Laura G., por ese puntillo rebelde que te hizo dedicarte al modelo de pollo, el lado oscuro, pese a nuestras advertencias; a Miguel Manzanares, gran orador donde los haya, por saber tanto y resolverme toda clase de dudas; a las Manzanitas (y Luis), especialmente a Teresa, Bárbara (siempre serás una Manzanita), Susana y Eva, porque sois un grupo genial, siempre dispuestas a ayudar a los demás; a Nacho Flores, porque lo mismo aportas ideas a cualquier tema posible que estableces un antes y un después con tu señor del sombrero en el retreat; a Esther, por enseñarme algún truquillo para el Nikon; dziękuję Dorota, for smiling at all times and helping me with Metamorph; a los de Lara Pezzi, por los libros de estadística para *dummies* y porque ha sido un placer, and indeed an honor, aprender de vosotros; y a los del grupo de la Pompa, porque formáis una piña indivisible, y especialmente a Luis, Guille, Gonzalo, Álvaro y San Gaetano, porque sin vuestras coñas esto no sería lo mismo.

Go raibh maith agat, Róisín, for embedding, cutting and staining the multiple limbs with the *Meis2*-overexpressing clones, and for all your histological advice. Grazie Giovanna, per essere stata la mia maestra dall'inizio, trasmettermi la tua esperienza e soprattutto realizzare il progetto de *gene targeting* fino al sudato successo. Gracias también a Nines y Paco, por sus tremendos esfuerzos para hacer el screening de las células ES, y a los chicos de transgénesis (Luismi, Chema y David), por su eficiencia en la generación de quimeras. I don't want to forget

## AGRADECIMIENTOS

---

Ola, thank you for having worked that hard during that summer, I'm still using the blocks and probes you prepared.

Gracias Óscar, compañero de biblioteca, por tu constante optimismo y confianza. En cuanto a Luis Alegre, un auténtico friki sin complejos, aunque desafortunadamente siervo del lado oscuro (la SGAE), gracias por toda la ayuda que nos prestas día a día.

Le debo mucho también a Marian Ros y a su grupo. Gracias Marian, por acogerme en tu laboratorio durante 9 semanas y encontrar tiempo para enseñarme tus truquillos para la manipulación del embrión de pollo. Gracias sobre todo por enseñarme la técnica de los recombinantes, pues no creo que queden muchas personas en el mundo que sepan hacerla. Ha sido un privilegio poder aprender de semejante experta. También disfruté bastante nuestras frecuentes discusiones (en sentido inglés, se entiende), que seguro continuarán durante la defensa de esta tesis.

En cuanto a Rushi, thank you dude, for sharing your wisdom and your friendship with me. I really enjoyed our "science and beer" sessions after some hard days in Santander, although I cannot think as fast as you after drinking a couple of pints. I wish you all the luck for the future. And remember... it's all about RA, Hox... and time.

Gracias también a Irene, las Marisas, Mamen y Carlos por toda la ayuda que me prestasteis cuando estaba por allí.

Thank you James, Luciano, Gaja, Bernd, Jelena and Jean François, for very interesting scientific discussions.

Although she will probably never read these words, I would also like to thank Margaret Kirby for her advice on egg windowing, which really improved the survival ratio of my grafts.

Thank you also to Cliff Tabin and his group, for sharing unpublished results and finding the time to answer the comments of a graduate student.

Quisiera agradecer en general a todos los que hacen posible que el CNIC funcione, y en particular a los que apostaron por asignar bastante dinero a la formación de los becarios; a las chicas de la biblioteca, que han conseguido que tengamos el mejor servicio de préstamo interbibliotecario del mundo; a los chicos de informática, especialmente a Juancar y Alicia, por no cansaros de nuestras incidencias, y a las chicas del animalario, porque no alcanzo a imaginar lo difícil que tiene que ser llevar una base de datos de 15000 ratones.

Por último, quiero dar las gracias a Pilar. Por tantas cosas que casi no sé por dónde empezar. Soy consciente de que eres la única persona en este mundo capaz de aguantar mis horarios... y cambiarlos (un poco). Sin ti estoy seguro de que me habría obsesionado con el trabajo del laboratorio hasta no hacer otra cosa. Gracias por hacer honor a tu nombre y servirme de constante apoyo. Gracias por tu optimismo y tu disposición para hablar de cualquier cosa, ya sea ciencia, religión... o incluso de juegos de rol. Gracias por servirme de ejemplo de eficiencia y aprovechamiento del tiempo. Aún no entiendo cómo eres capaz de hacer tantas cosas y tan bien. Eres increíble Basileia.

Y hasta aquí puedo leer... ¡Gracias a todos!



